

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Biochemie



Mgr. Jan Milichovský

Cílená mutageneze ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a
jejich interakčních partnerů

Site-directed mutagenesis of human cytochromes P450 family 1 and their
interacting partners

Disertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.7.2016

Podpis:

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašuji, že Mgr. Jan Milichovský rozhodujícím způsobem (30-70%) přispěl ke vzniku publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací

V Praze dne

.....

Doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za jeho vedení, poskytnutou podporu během průběhu vypracování práce a za jeho trpělivost nejen při opravách textu předkládané práce.

Děkuji i všem ostatním členům Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv a dalším členům katedry biochemie za vytvoření příjemného pracovního a studijního prostředí, ve kterém jsem se mohl pohybovat víceméně od prvního vstupu do bran Chemického ústavu PřF UK.

Neméně děkuji i své rodině za podporu během celého studia.

A nakonec děkuji i svým kolegům z mého současného mimofakultního působení, jejichž vysoká odbornost a cílevědomost mi poskytly nejen možnost k posunu v profesním životě, ale vedly mne i k dopsání této práce.

Tato diplomová práce vznikla na katedře biochemie PřF UK v Praze za podpory GAUK 1380214, UNCE 204025/2012, GAČR 14-18344S

Abstrakt

Cytochromy P450 jsou rozsáhlou skupinou proteinů metabolizujících široké množství substrátů. Řada z nich se významně podílí na metabolismu léčiv či jiných xenobiotik včetně řady chemických karcinogenů.

Hemoprotein cytochrom b_5 je jedno-elektronový přenašeč elektronů spolupracující s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a NADH:cytochrom b_5 reduktasou 3, který je spjatý s metabolismem zprostředkovaným cytochromy P450. Cytochrom b_5 je schopen prostřednictvím modulace aktivity cytochromů P450 ovlivňovat metabolismus řady látek.

Cílem disertační práce bylo využít místně cílenou mutagenezi cytochromů P450 rodiny 1 k lepšímu porozumění mechanismu jejich nitroreduktasové aktivity. Dále byla studována interakce cytochromu b_5 s cytochromy P450 podrodiny 1A pomocí místně cílené mutagenese jejich předpokládaného kontaktního rozhraní. V rámci práce byly také, za použití kombinace experimentu a teoretických přístupů, studovány rozdíly v redukci lidských cytochromů P450 v intaktních bakteriálních buňkách během jejich heterologní exprese.

Z výsledků vyplývá, že nitroreduktasová aktivita CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 je zprostředkována hydroxylovou skupinou v aktivním místě a jejím zavedením lze u CYP1B1 uměle vyvolat nitroreduktasovou aktivitu. Pomocí mutagenese byly také identifikovány aminokyseliny, které se pravděpodobně účastní interakce lidského membránového cytochromu b_5 s CYP1A1 a CYP1A2. Dále bylo také zjištěno, že některé cytochromy P450 produkované v bakteriálním systému jsou prakticky kompletně redukovány přímo v hostitelské buňce, zatímco jiné jsou redukovány jen minimálně. Proteinem, podílejícím se na tomto jevu je pravděpodobně bakteriální flavoprotein - flavodoxin.

Klíčová slova: cytochromy P450, heterologní exprese, protein-protein interakce, „site-directed“ mutagenese

Abstract

Cytochromes P450 represent a large group of proteins metabolizing variety of substrates. Many of them are responsible for metabolism of xenobiotics including drugs and chemical carcinogens.

Heme-protein cytochrome b_5 is a single-electron donor cooperating with a NADPH:cytochrome P450 reductase and NADH:cytochrome b_5 reductase 3 enzyme. Cytochrome b_5 can affect the xenobiotic metabolism via modulation of the cytochromes P450 activity.

One of the goals of the Ph.D. thesis was to utilize site directed mutagenesis of cytochromes P450 family 1 to elucidate the mechanism of their nitroreductase activity. Another aim was to study the interaction between cytochrome b_5 and cytochromes P450 of the 1A subfamily using site directed mutagenesis on presumed protein-protein contact interface. Another goal was to utilize the combination of theoretical and experimental approaches to explain variance in the reduction state of several human cytochromes P450 heterologously expressed in intact bacterial cells.

The results found in the thesis show that nitroreductase activity of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 is mediated by the presence of a particular hydroxyl group in their active centre. Single mutation introducing a hydroxyl group to the specific part of CYP1B1 active site to the active site turned on its artificial nitroreductase activity. Other results identified several amino acids residues located on the contact of cytochrome b_5 with CYP1A1 or CYP1A2. Finally the results of combined theoretical and experimental approaches suggest that the differences in reduction state of human cytochromes P450 heterologously expressed in intact bacterial cells, which can be related to the differences in their interaction with bacterial electron donating protein - flavodoxin.

Keywords: cytochromes P450, heterologous expression, protein-protein interactions, site-directed mutagenesis

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1. Přehled literatury	12
1.1 Cytochromy P450	12
1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450	13
1.1.2 Strukturní vlastnosti cytochromů P450	13
1.1.3 Reakční mechanismus cytochromu P450	18
1.2 Lidské cytochromy P450 a jejich funkce	19
1.3 Cytochromy P450 rodiny 1	23
1.3.1 Cytochrom P450 1A1	23
1.3.2 Cytochrom P450 1A2	24
1.3.3 Cytochrom P450 1B1	25
1.3.4 Aktivní centrum cytochromů P450 rodiny 1	26
1.4 NADH:cytochrom b ₅ reduktasa 3	27
1.5 Cytochrom b ₅	28
1.5.1 Formy savčího cytochromu b ₅	29
1.5.2 Struktura cytochromu b ₅	29
1.6 Vliv cytochromu b ₅ na cytochromy P450	30
1.6.1 Vliv cyt b ₅ na CYP3A4	31
1.6.2 Vliv cyt b ₅ na CYP17A1	32
1.6.3 Vliv cyt b ₅ na CYP2E1	33
1.6.4 Vliv cyt b ₅ na cytochromy P450 podrodiny CYP1A	33
2. Cíle disertační práce	35
3. Materiál a metody	37
3.1 PŘÍPRAVA PLASMIDŮ	40
3.1.1 Příprava expresních plasmidů pro CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1	42
3.1.2 Příprava expresních plasmidů pro ostatní cytochromy P450	44
3.1.3 Příprava expresního plasmidu pro lidský cytochrom b ₅ (cyt b ₅)	45
3.1.4 Příprava expresního plasmidu pro lidskou NADH:cytochrom b ₅ reduktasu 3 (CYB5R3)	47
3.2 MÍSTNĚ CÍLENÁ MUTAGENEZE	48
3.2.1 Mutageneze lidského genu pro cytochrom b ₅	49

3.2.2	<i>Mutagenese genů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1</i>	50
3.3	REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE PROTEINŮ	51
3.3.1	<i>Heterologní exprese lidské NADH:cytochrom b₅ reduktasy</i>	51
3.3.2	<i>Heterologní exprese potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR)</i>	52
3.3.3	<i>Heterologní exprese membránových forem cytochromu b₅</i>	55
3.3.4	<i>Heterologní exprese forem cytochromů P450 rodiny I</i>	57
3.3.5	<i>Heterologní exprese dalších forem cytochromu P450</i>	59
3.4	ANALYTICKÉ METODY	60
3.4.1	<i>Stanovení koncentrace proteinů</i>	60
3.4.2	<i>Stanovení koncentrace cytochromu P450</i>	61
3.4.3	<i>Stanovení koncentrace NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i>	61
3.4.4	<i>Stanovení koncentrace NADH:cytochrom b₅ reduktasy 3</i>	62
3.4.5	<i>Stanovení aktivity NADH:cytochrom b₅ reduktasy 3 vůči cytochromu b₅</i>	62
3.4.6	<i>Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)</i>	62
3.5	STUDIUM METABOLISMU SUBSTRÁTŮ CYTOCHROMŮ P450	64
3.5.1	<i>Metabolismus Sudanu I jaterními mikrosomy a rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému</i>	64
3.5.2	<i>Metabolismus fenacetinu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému</i>	66
3.5.3	<i>Metabolismus acetanilidu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému</i>	68
3.5.4	<i>Metabolismus lidokainu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému</i>	70
3.5.5	<i>Stanovení aktivity cytochromů P450 pomocí derivátů resorufinu</i>	71
3.5.6	<i>Analýza aduktů aristolochové kyseliny I s DNA metodou ³²P-postlabeling</i> ..	72
3.5.7	<i>Stanovení oxidace aristolochové kyseliny I cytochromy P450</i>	72
4.	Výsledky a diskuse	74
4.1	PŘÍPRAVA PLASMIDŮ A HETEROLOGNÍ EXPRESE PROTEINŮ	74
4.1.1	<i>Příprava plasmidů a heterologní exprese forem CYP1A1</i>	74
4.1.2	<i>Příprava plasmidu a heterologní exprese forem CYP1A2</i>	78
4.1.3	<i>Příprava plasmidů a heterologní exprese forem CYP1B1</i>	83
4.1.4	<i>Příprava plasmidů a heterologní exprese ostatních forem CYP</i>	86
4.1.5	<i>Příprava plasmidů a heterologní exprese forem cyt b₅</i>	87

4.1.6	<i>Popis plasmidu a heterologní exprese CPR</i>	91
4.1.7	<i>Příprava plasmidu a heterologní exprese CYB5R3</i>	93
4.2	REDUKCE SAVČÍCH CYTOCHROMŮ P450 V INTAKTNÍCH BAKTERIÁLNÍCH BUŇKÁCH A POTENCIÁLNÍ ROLE FLAVODOXINU	96
4.3	STUDIUM VLIVU MUTACE POLÁRNÍHO REZIDUA V AKTIVNÍM MÍSTĚ CYP1A1, CYP1A2 A CYP1B1 NA JEJICH ENZYMOVOU AKTIVITU	100
4.4	STUDIUM AKTIVITY LIDSKÝCH REKOMBINANTNÍCH CYTOCHROMŮ P450 V REKONSTITUOVANÝCH SYSTÉMECH.....	106
4.4.1	<i>Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅</i>	107
4.4.2	<i>Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b₅</i>	110
4.4.3	<i>Ovlivnění aktivity mutantních cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b₅</i>	115
4.4.4	<i>Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b₅ ve spojení s NADH:cytochrom b₅ reduktasou</i>	120
5.	Závěr	124
6.	Literatura	126
7.	Seznam příloh	135

Seznam použitých zkratk

A	adenin
AAI	aristolochová kyselina I
ALA	δ -aminolevulová kyselina
APS	persíran amonný
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
bp	párů bází („Base Pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
CPR	NADPH: cytochrom P450 reduktasa
CYB5R3	NADH: cytochrom b ₅ reduktasa 3
CYP	cytochrom P450
cyt b ₅	membránová forma cytochromu b ₅
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTANa ₂	ethylendiamintetraoctová kyselina (sodná sůl)
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
G	guanin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktosid
LB médium	Luria Broth médium
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina

NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
ori	počátek replikace DNA
PCR	polymerasová řetězová reakce
RPM	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
T	thymín
TB médium	Terrific Broth médium
TEMED	N,N,N', N' - tetramethylethylendiamin
Tris-Cl	pufr vzniklý z tris(hydroxymethyl)aminomethanu s daným pH vyrovnaným pomocí HCl
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku

1. Přehled literatury

1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou rozsáhlou skupinou proteinů obsahující přes dvacet tisíc zástupců. Znalosti o těchto proteinech se pohybují od úrovně detailního popsání aktivního místa některých z nich přes postupné rozkrývání mechanismu mnoha katalyzovaných reakcí až po fragmenty sekvencí dalších členů z mnoha proteomických studií [1].

Tyto enzymy byly objeveny na konci šedesátých let 20. století v potkaních mikrosomech (fragmentech endoplasmatického retikula) při sledování posunu charakteristického spektrálního absorpčního maxima redukované formy s navázaným oxidem uhelnatým, používané metody ke stanovení hemoproteinů [2]. Vyskytují se ale u všech forem života a také virů, což ukazuje tabulka 1. Stále jsou objevovány noví zástupci této superrodiny proteinů, což je zřejmé na datech z roku 2013 a jejich změny vůči datům z roku 2009.

Tab. 1 Zařazené cytochromy P450 dle typu organismu, k srpnu 2013.
Upraveno dle [3]

Typ organismu	Počet cytochromů P450 (2009)	Počet cytochromů P450 (2013)
Živočichové	3282	6313
Rostliny	4266	7446
Houby	2570	5729
Protisté	247	247
Bakterie	905	1254
Archaeobakterie	22	48
Viry	2	2
Celkem	11294	21039

Cytochromy P450 se pravděpodobně vyvinuly divergentní evolucí z jednoho genu v superrodinu proteinů katalyzujících velkou škálu reakcí. Vznik prvního proteinu cytochromu P450 je odhadován u předchůdce prokaryot před 3,5 miliardami let [4].

1.1.1 Nomenklatura cytochromů P450

Dlouhou dobu bylo používáno několik odlišných nomenklatur cytochromů P450 a jednotlivé typy proteinů byly v publikacích označovány několika jmény. Příkladem může být cytochrom P450 1A1, který byl dříve označován jako CYP-forma 6, CYP-C nebo CYP-P1. V polovině osmdesátých let dvacátého století byla vytvořena Komise pro standardizovanou nomenklaturu eukaryotických cytochromů P450, která vydala své první doporučení pro sjednocení nomenklatury [5].

Nomenklatura byla vytvořena srovnáváním aminokyselinových sekvencí cytochromů P450, načež byla tato superrodina proteinů rozdělena do rodin a podrodin podle těchto pravidel [5,6].

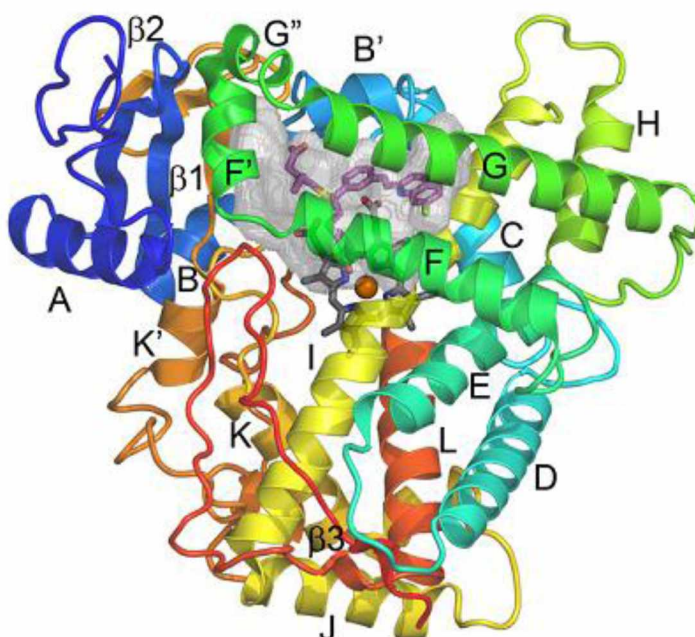
- z anglického názvu proteinu „cytochrome P450“ se vytvoří zkratka CYP
- proteiny, jejichž primární struktura má homologii vyšší než 40 % se zařadí do stejné rodiny a označí se arabskou číslicí (např. CYP1)
- proteiny, které mají homologii aminokyselinové sekvence vyšší, než 55 % se řadí do jedné podrodiny označené písmenem (např. CYP1A). Při vyčerpání písmen abecedy se podrodina nazve AA, AB nebo později BB
- samotná forma proteinu je po zařazení do rodiny a podrodiny označena pořadovým číslem (např. CYP1A1)

Nomenklатурní pravidla jsou tedy založena na porovnání sekvence aminokyselin a není důležitá přítomnost kofaktoru nebo katalyzovaná reakce.

1.1.2 Strukturní vlastnosti cytochromů P450

Strukturní data byla nejprve získána pro solubilní bakteriální typ proteinu, přičemž později získané modely eukaryotních a především savčích forem jsou bakteriálním formám velmi podobné. Obecně jsou CYP vyšších živočichů membránově vázané a ve své molekule tedy obsahují membránovou doménu, ta však byla pro potřeby rentgenostrukturní analýzy většinou odstraněna molekulárně-biologickou manipulací DNA sekvence příslušného genu [7]. Výjimku tvoří lidský CYP19A1, jehož úspěšně krystalizovaný preparát byl izolován přímo z placenty [8]. Modely bakteriálních CYPů obsahují dvanáct konzervovaných α -helikálních prvků označovaných A až L a β -list

v blízkosti N-konce proteinu [9]. Počet α -helixů je u eukaryotních forem většinou vyšší, ale ty jsou méně konzervované. Protein obsahuje kavitu v blízkosti vázaného hemu, která umožňuje přístup substrátu k aktivnímu centru enzymu (Obrázek 1). Helixy C, D a I až L společně s β -listy tvoří strukturní jádro proteinu obsahující vazné místo pro hem a místo pro vazbu substrátu. Helixy F až G, B až C a koncové části tvoří vnější hranici kavity a vykazují vyšší flexibilitu [7]. Obrázek 1 ukazuje obecnou topologii struktury cytochromů P450.



Obr. 1 Obecná topologie cytochromu P450

Model CYP2C8 (PDB 2NNI), barvený modře (N-konec) k červené (C-konec). Kavita je zobrazena jako průsvitná oblast. Strukturně konzervované α -helixy jsou pojmenovány A-L, ostatní jsou označeny písmeny s apostrofy. Šedou barvou je ukázána struktura hemu, růžovou barvou vázaný substrát, zde molekula montelukastu; převzato z [7]

S postupem sekvenačních projektů na začátku tisíciletí na různých organismech bylo možné porovnávat sekvence mnoha CYPů a hledat konzervované znaky pro všechny členy superrodiny. Do úvahy se tak dostaly dva konzervativní znaky [9]:

- Sekvence EXXR tvořící iontový pár v helixu K
- Cystein fungující jako pátý ligand iontu železa v hemu

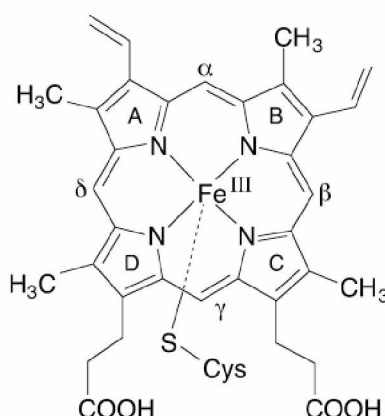
Sekvence EXXR byla považována za nutnou pro správné složení struktury. V roce 2006 byl ale objeven první z proteinů, který tuto sekvenci neobsahoval, a naopak její rekombinantní inserce strukturu zničila. Jedná se o protein z rodiny CYP157, který se

vyskytuje u bakterie *Streptomyces coelicolor* a je prvním ze čtyř popsanych CYPů postrádajících zmíněný motiv [11].

Posledním znakem byla přítomnost cysteinu jako pátého ligandu hemového železa. Po nedávném objevu hmyzí rodiny CYP408 a jejích dvou zástupců byl ale vyvrácen i tento znak, jelikož oba proteiny postrádají konzervovaný cystein, a přesto se díky své primární sekvenci počítají mezi cytochromy P450. Jiným podobným proteinem by mohl být EryCII [12], ale 20% sekvenční identita je pod hranicí 25 % identity, kde je nemožné rozlišit podobnost a homologii od náhodně uspořádané sekvence. Funkce CYP408 není známa a řadí se k takzvaným „sirotčím proteinům“, které nemají známý substrát a funkci [10].

Některé cytochromy P450 jsou upraveny posttranslačními modifikacemi. Nejčastější zachycenou a nejvíce prozkoumanou modifikací je fosforylace, dále byla popsána glykosylace a nitrace [13]. Fosforylace, provedená protein kinasou A nebo protein kinasou C, se vyskytuje i u klinicky nejvýznamnějšího CYP3A4. Za funkci samotné fosforylace, je považováno označování cytochromů P450 se ztracenou funkcí nebo k urychlení degradace proteasomem buňky [14]. U některých CYP vede fosforylace k odkrytí kryptické signální sekvence, která původně retikulární protein vede do mitochondrie [15].

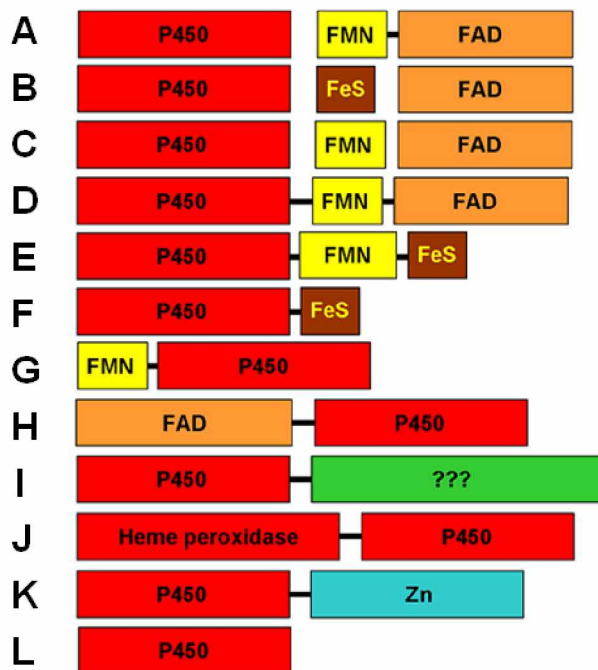
Drtivá většina známých cytochromů P450 má ve svém aktivním centru hem (protoporfyrin IX s koordinovaným iontem železa). Ten je přes ion železa vázán ke zbytku cysteinu (obrázek 2). Tento cystein je pátým ligandem hemového železa a je odpovědný za charakteristický posun absorpčního maxima do oblasti 450 nm, který nastává při vytvoření komplexu redukovaného hemu s oxidem uhelnatým [16].



Obr. 2 Hem

Prosthetická skupina cytochromů P450 vázaná přes centrální atom železa ke zbytku cysteinu. Převzato z [16].

Cytochromy P450 se řadí k několika typům dle závislosti na proteinu či redoxním systému proteinů dodávajících reakční elektrony. Jejich přehled, v němž jsou spolupracující proteiny rozděleny dle jejich kofaktorů, ukazuje obrázek 3 [17]:



Obr. 3 Rozdělení redoxních systémů cytochromů P450

Bližší informace jsou podány v textu, rozdělení písmeny není závazné z hlediska nomenklatury; velikost rámečků odpovídá velikostem proteinů nebo jejich domén. Modrý obdélník „Zn“ označuje hydrolasovou doménu, zelený obdélník „??“ označuje proteinovou doménu neznámé funkce. Převzato a upraveno z [17]

V eukaryotech se vyskytují pouze proteinové systémy označené A a B, většina bakteriálních proteinových redoxních systémů je typem C.

Obrázek 3 ukazuje schopnost superrodiny cytochromů P450 spolupracovat i s jinými proteiny rozdílnými od tradičně uváděných. Díky rozrůstajícímu se počtu enzymů byly objeveny i dosti nečekané kombinace, včetně zde neuvedené a dříve zmíněné rodiny CYP408 postrádající prosthetickou skupinu. Následuje stručný popis ukázaných proteinových spojení s příkladem CYP, který je tímto systémem podporován [17]:

- **Ad A:** eukaryotický systém vázaný na vnější membránu endoplasmatického retikula. Obsahuje membránově vázaný CYP s membránově vázanou NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR). Příkladem proteinu využívajícího tento systém je lidský CYP1A2

- **Ad B:** eukaryotický systém vázaný ve vnitřní membráně mitochondrie. Obsahuje membránově vázaný CYP interagující se solubilním FeS proteinem adrenodoxinem. Ten získává elektrony od solubilní NADPH:adrenodoxin reduktasy. Většina bakterií používá stejný systém, v němž jako nosiče elektronů funguje ferredoxin a NADPH:ferredoxin reduktasa. Příkladem je lidská CYP11A1
- **Ad C:** přenašeč ferredoxin je nahrazen flavodoxinem. Příkladem je CYP107H1 z *Bacillus subtilis*.
- **Ad D:** fúze CYP a CPR, příkladem je CYP102A1 z *Bacillus megaterium*
- **Ad E:** fúze CYP a ftalátoreduktasy, příkladem je podrodina CYP111B z *Pseudomonas incognita*
- **Ad F:** fúze CYP a ferredoxinu, příkladem je CYP51FX z *Methylococcus capsulatus*
- **Ad G:** fúze CYP a flavodoxinu, příkladem je protein známý jako XplA z *Rhodococcus rhodochorus*. Je schopen odbourávat nitrované výbušniny.
- **Ad H:** fúze CYP a acyl-CoA dehydrogenasy u proteinu CYP222A1 z *Pseudomonas fluorescens*
- **Ad I:** fúze CYP a proteinu neznámé funkce. Jedná se o virový CYP5253A1
- **Ad J:** fúze CYP a dioxygenasy/peroxidasy. Nalezeno u proteinu z *Aspergillus nidulans*
- **Ad K:** fúze CYP a hydrolasy obsahující zinek, protein je znám jako CYP631B5 z *Penicillium brevicompactum*
- **Ad L:** samostatně fungující CYP, příkladem je CYP5A1 nebo thromboxansyntasa provádějící isomeraci prostaglandinu

Artificiální bakteriální přenašeče elektronů mohou redukovat i membránové CYPy. Bylo zjištěno, že bakteriální flavodoxin je schopen redukovat hovězí CYP17A1 a lidský CYP1A2 in vitro [18, 19].

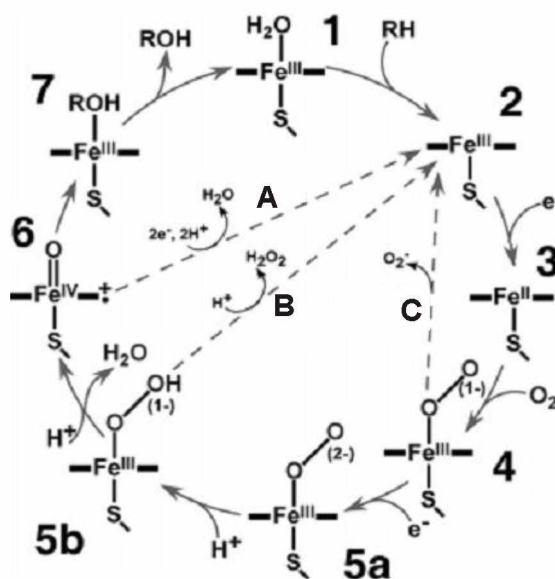
1.1.3 Reakční mechanismus cytochromu P450

Obecná reakce enzymu (CYP) je vložení jednoho kyslíkového atomu do struktury substrátu. Jelikož je použit právě jediný atom kyslíku, řadí se protein mezi monooxygenasy [20].



Podrobnější informace o reakčním cyklu cytochromu P450 podává obrázek 4 a přidružený text [16]:

- substrát vázající se na nízkospinovou ferri-formu proteinu (**1**) do okolí aktivního centra způsobí odstoupení molekuly vody, která je v klidovém stavu vázána k hemovému železu jako šestý ligand. To změní nízkospinový komplex na vysokospinový (**2**). Tento stav je nazýván také „resting state“.



Obr. 4 Reakční schéma cytochromu P450.

Bližší informace v textu. Převzato a upraveno z [16].

- vysokospinová forma má více pozitivní redukční potenciál a je prvním elektronem redukována na ferro-formu (**3**). V tomto kroku se může na atom železa vázat také oxid uhelnatý.
- na redukované železo se váže molekula kyslíku a ustavuje se oxo-ferri komplex (**4**).

- následuje redukce druhým elektronem, čímž vzniká peroxo-ferri forma (**5a**). Ta je protonována za vzniku hydroperoxo-ferri formy (**5b**).
- vzdálenější atom kyslíku od atomu železa je redukován a dochází k hydrolýze vazby mezi atomy kyslíku, formuje se oxo-ferryl intermediát zvaný „sloučenina I“ (**6**) a voda.
- posledním krokem je oxygenace produktu a jeho uvolnění (**7**).

Oxo-ferro komplex (**4**) je posledním relativně stabilním intermediátem cyklu. Podoba následných intermediátů je stále předmětem výzkumu.

V mechanismu se nachází také tři zpětné reakce:

- A) Oxidasová cesta, během které je oxo-ferryl intermediát redukován do základního stavu za uvolnění vody bez oxygenace substrátu.
- B) Peroxidová cesta, při které se protonací hydroperoxo-ferri formy z iontu železa uvolní peroxid vodíku.
- C) Autooxidace oxo-ferri formy s návratem do vysokospinové ferro-formy se vznikem superoxidového aniontu.

1.2 Lidské cytochromy P450 a jejich funkce

V lidském genomu se vyskytuje 57 aktivních genů cytochromu P450 a 58 mutovaných a neaktivních pseudogenů [3]. Z aktivních forem 50 genů kóduje proteiny vyskytující se na membráně endoplasmatického retikula a nazývané mikrosomální a 7 genů kóduje mitochondriální formy. Jejich přehled uvádí tabulka 2. Tyto proteiny se nachází především v játrech, ale nalézají se i v dalších částech lidského těla.

Jak je uvedeno v kapitole 1.1.2 a na obrázku 3, savčí cytochromy P450 vázané v mitochondrii při svém enzymovém cyklu získávají elektrony od NADPH přes dva rozpustné proteiny, NADPH:adrenodoxin reduktasu a adrenodoxin [21]. Na stejném obrázku je uvedena i spolupráce mikrosomálních cytochromů P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, která je také ukotvena v membráně endoplasmatického retikula [22]. Ta ve své struktuře obsahuje flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD)

[23], což jsou kofaktory vyskytující se společně jen ve čtyřech savčích enzymech. Doména s FAD váže NADPH, zatímco doména s FMN se váže na cytochrom P450 [24].

Jednou z funkcí cytochromů P450 je metabolismus cizorodých látek (xenobiotik), na kterém se podílí především rodiny 1 až 4. Data z tabulky 2 ukazují, že ostatní rodiny cytochromů P450 zasahují do metabolismu dalších látek a především eikosanoidů [24].

Tab. 2 Přehled funkcí jednotlivých lidských cytochromů P450.

Převzato z [24]

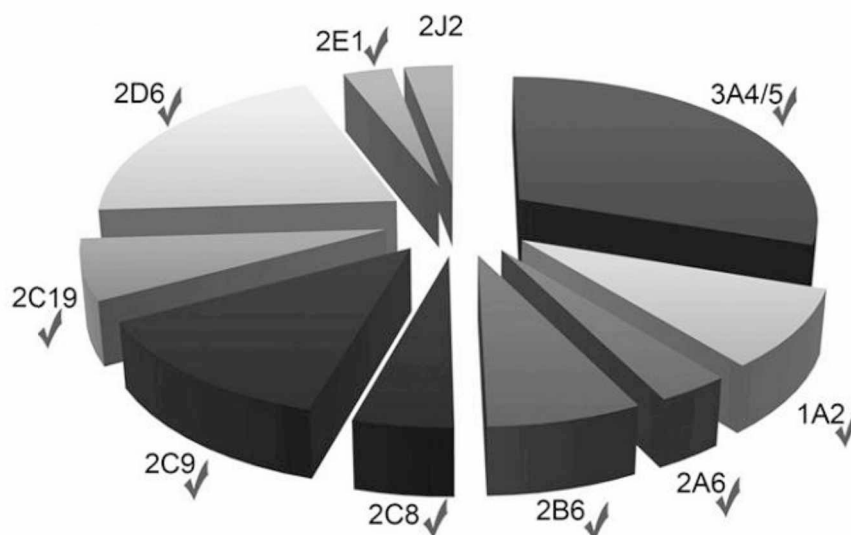
Protein	Funkce
CYP1A1	metabolismus eikosanoidů; xenobiotik
CYP1A2	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP1B1	metabolismus eikosanoidů; xenobiotik
CYP2A6, 2A13	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2A7	metabolismus nitrosaminu
CYP2B6	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2D6	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2E1	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2F1	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2J2	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP2R1	25-hydroxylace vitamínu D
CYP2S1	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik; retinoidů
CYP2U1	metabolismus eikosanoidů; mastných kyselin; léčiv; xenobiotik
CYP2W1	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik;
CYP3A4	metabolismus eikosanoidů; hormonů; více než 60% užívaných léčiv; xenobiotik;
CYP3A5, 3A7, 3A43	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP411	metabolismus eikosanoidů; mastných kyselin; léčiv; xenobiotik
CYP4A22	neznámá funkce
CYP4B1	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik

CYP4F2, 4F3, 4F8	metabolismus eikosanoidů; léčiv; xenobiotik
CYP4F11	neznámá funkce
CYP4F12	metabolismus eikosanoidů; mastných kyselin; léčiv; xenobiotik
CYP4F22	neznámá funkce
CYP4V2	neznámá funkce
CYP4X1	neznámá funkce
CYP4Z1	metabolismus eikosanoidů; mastných kyselin; léčiv; xenobiotik
CYP5A1	metabolismus eikosanoidů; znám jako thromboxan A ₂ syntasa TBXAS1; podíl na agregaci krevních destiček
CYP7A1	cholesterol 7 α -hydroxylasa, syntéza žlučových kyselin
CYP7B1	neurosteroid 7 α -hydroxylasa, oxysterol-7 α -hydroxylasa
CYP8A1	metabolismus eikosanoidů; znám jako prostacyclin (PGI ₂) syntasa PTGIS; podíl na agregaci krevních destiček
CYP8B1	sterol 12 α -hydroxylasa
CYP11A1	štěpení postranního řetězce cholesterolu
CYP11B1	steroid 11 β -hydroxylasa
CYP11B2	steroid 11 β - a 18-hydroxylasa, také 18-oxidasa
CYP11B1-11B2	chimérní enzym, překřížení dvou genů, vyvolává aldosteronismus
CYP17A1	steroid 17 α -hydroxylasa, 17,20-lyasa
CYP19A1	androgen aromatasa, estrogen syntetasa
CYP20A1	neznámá funkce
CYP21A2	steroid 21-hydroxylasa
CYP24A1	vitamin D 24-hydroxylasa
CYP26A1	inaktivace kyseliny retinové (hydroxylasa)
CYP26B1	inaktivace kyseliny retinové (hydroxylasa)
CYP26C1	inaktivace kyseliny retinové (hydroxylasa)
CYP27A1	syntéza žlučových kyselin, sterol 27-hydroxylasa, vitamin D 25-hydroxylasa
CYP27B1	25-hydroxy-vitamin D 1 α -hydroxylasa

CYP27C1	neznámá funkce
CYP39A1	oxysterol 7 α -hydroxylasa
CYP46A1	cholesterol 24-hydroxylasa v mozku
CYP51A1	lanosterol 14 α -demethylasa

V tabulce 2 zmíněný metabolismus eikosanoidů zahrnuje metabolismus kyseliny arachidonové, eikosapentaenové a dokosaheptaenové. Bylo identifikováno přes 150 eikosanoidů podílejících se na téměř na každém procesu buňky, počítají se mezi ně prostaglandiny, thromboxany, leukotrieny, epoxyeikosatriinové kyseliny a jejich deriváty, lipoxiny a další [25].

Jak je zřejmé, cytochromy P450 mají velký význam v přeměně xenobiotik, která mohou být metabolizována na karcinogeny. V souvislosti s metabolismem léčiv (obrázek 5) se může objevit idiosynkratická (individuální) toxicita na určitá léčiva. Tu většinou nelze zachytit během klinických testů a je tak zjištěna až po uvedení léku mezi spotřebitele. Takovým případem je například hepatitis vyvinutý u malého počtu pacientů v případě kyseliny teinilové v důsledku působení na CYP2C9 [26].



Obr. 5 Význam cytochromů P450 v metabolismu léčiv

Data pro 248 léčiv podléhajících metabolické dráze se zapojením cytochromů P450. Každá dráha byla zanesena pouze jednou podle metabolicky majoritní formy proteinu. Byly vynechány metabolické dráhy endogenních substrátů a chemikálií. Odškrtnutím značené formy mají vyřešenou a veřejně přístupnou proteinovou strukturu. Označení 3A4/5 znamená zahrnutí obou forem, protože jejich zapojení do metabolické dráhy je často nemožné rozlišit; převzato z [7].

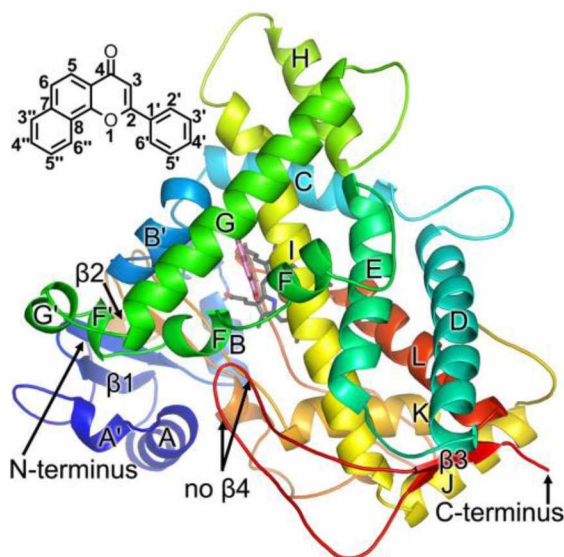
1.3 Cytochromy P450 rodiny 1

Rodina CYP1 sestává ze tří členů, CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Proteiny jsou polymorfní, mají tedy více alel, které mohou vykazovat rozdílnou aktivitu u jejich nositelů [27].

1.3.1 Cytochrom P450 1A1

Tento protein, sestávající z 512 aminokyselin, se nachází především v extrahepatálních tkáních, v samotných játrech je jeho exprese nízká, v porovnání se všemi mikrosomálními proteiny se odhaduje na 3 pmol/mg [28, 29]. Jeho hladina však může být výrazně zvýšena působením induktorů, vesměs ligandů Ah-receptoru (např. TCDD), takže jeho zastoupení v lidských játrech bývá často podstatně vyšší [29, 30]. Vyskytuje se v plicích, tenkém střevě, ledvinách, mozku, placentě a v kůži [29, 31]. Na úrovni mRNA byl detekován v hrtanu a tlustém střevě [32, 33].

Cytochrom P450 1A1 metabolizuje řadu heterocyklických aminů a společně s CYP1B1 odpovídá za přeměny polycyklických aromatických uhlovodíků [34]. S CYP1B1 a CYP1A2 sdílí i celou řadu inhibitorů, například α -naftoflavon, který je ale efektivnějším inhibitorem CYP1A2 [35]. Strukturu CYP1A1 (obrázek. 6) se podařilo získat krystalizací proteinu s upravenou sekvencí [36].



Obr. 6 Struktura lidského CYP1A1

Sekundární struktura proteinu je barvena přechodem modré barvy do červené od N-konce proteinu do jeho C-konce, převzato z [36]

Tento enzym se stejně jako několik dalších mikrosomálních cytochromů P450 nachází i na vnitřní membráně mitochondrie. Potkaní protein, který měl jaterní endoproteasou odštěpeny čtyři N-koncové aminokyseliny, byl inkorporován právě do mitochondriální membrány, což vede k možnosti existence kryptického mitochondriálního transportního signálu [37]. Takto lokalizovaný CYP1A1 je schopen metabolizovat erythromycin, čímž vykazuje odlišnou substrátovou specifitu oproti mikrosomální formě, což je nejspíš dáno spojením s funkcí mitochondriální NADPH:ferredoxin-reduktasy [38].

Cytochrom P450 1A1 má 15 popsáných alel (39). Výskyt těchto mutací v aminokyselinové sekvenci by mohl ovlivňovat katalytické schopnosti, a tím ovlivňovat metabolismus xenobiotik a produkci karcinogenních látek, avšak to zatím u CYP1A1 nebylo obecně prokázáno. Epidemiologické studie sice naznačily možnost spojení mutace I462V s incidencí nádorů plic u japonské populace [40], to však nebylo potvrzeno u indoevropanů [41, 42]. Tato mutace je zodpovědná až za 12-tinásobné zvýšení aktivit vůči estronu a 17 β -estradiolu [43].

1.3.2 Cytochrom P450 1A2

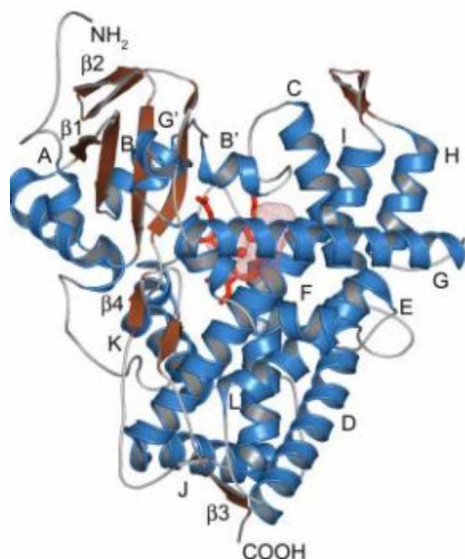
Tento enzym je nejvíce přítomen v jaterní tkáni [44]. Jeho průměrné zastoupení v poměru vůči ostatním mikrosomálním proteinům je 18 až 25 pmol/mg dle hmotnostní spektrometrie [45, 46] a 65 pmol/mg dle imunochemických metod [47]. Tyto hodnoty odpovídají 4 až 16 % podílu z množství všech jaterních cytochromů P450.

Byl však detekován i v plicích, prostatě, gastrointestinálním traktu a mozku a na úrovni mRNA v kůži [30, 48]. Protein je indukibilní a mezi jeho induktory patří N-heterocyklické aminy v cigaretovém kouři a grilovaném mase, kofein, omeprazol a konzumace brukvovité zeleniny [49, 50]. Část těchto induktorů může být stejným enzymem metabolizována.

Protein sestávající z 515 aminokyselin je posttranslačně upraven odstraněním N-koncového methioninu [51]. Strukturu CYP1A2 (obrázek 7, strana 25) se podařilo získat krystalizací proteinu s upravenou sekvencí [52].

CYP1A2 mimo řadu karcinogenů a prokarcinogenů metabolizuje i celou řadu užívaných léčiv. Příkladem je antipyretikum paracetamol, dále látky ze skupiny antipsychotik, antidepresiv, protizánětlivých léků, kardiovaskulárních léků. Také

metabolizuje lék na Alzheimerovu chorobu (takrin). Hlavními endogenními substráty jsou arachidonová kyselina, prostaglandiny, melatonin, retinová kyselina a estrogenery [24, 53].



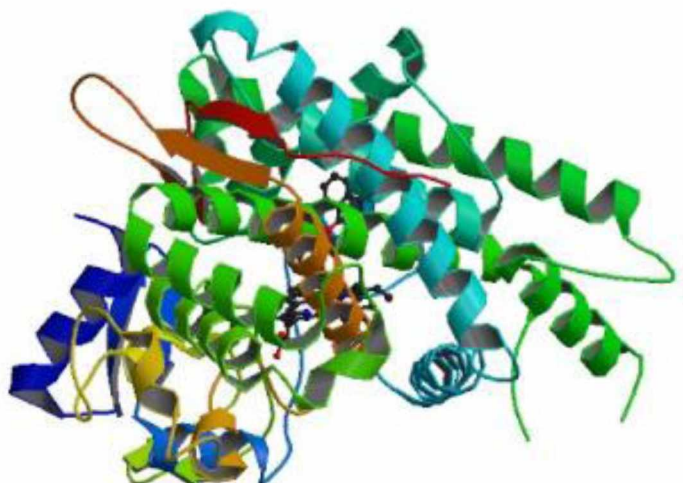
Obr. 7 Struktura lidského CYP1A2

Sekundární struktura je zobrazena s označením strukturních motivů; α helixy jsou barveny modře, β -listy jsou barveny hnědou barvou. Převzato z [52].

Protein má potvrzených 21 alel (54). Substituce Arg431Trp v alele *CYP1A2**6 vede k expresi nefunkčního proteinu [55]. Jiné alely způsobují nižší inducibilitu proteinu v případě různých induktorů, ale vzhledem k velmi malému zastoupení mutantních alel v populaci není polymorfismus genu považován za určující faktor fenotypu [56].

1.3.3 Cytochrom P450 1B1

Tento protein, mající 543 aminokyselin, se vyskytuje hlavně v endoplasmatickém retikulu extrahepatálních tkání, nejvíce v ledvinách, prostatě, močovém měchýři, mozku, plicích a gastrointestinálním traktu [57, 58]. Prostorové uspořádání tohoto enzymu určené pomocí rentgenostrukturní analýzy ukazuje obrázek 8 (strana 26) [59].



Obr. 8 Struktura lidského CYP1B1

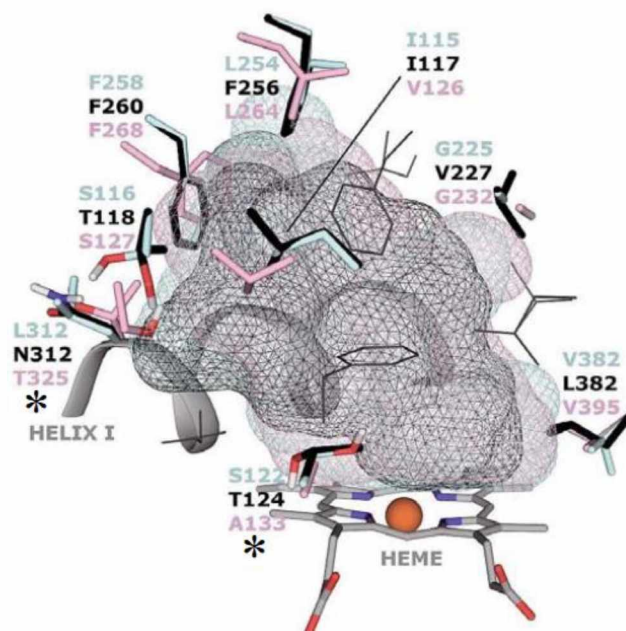
Převzato z [59].

CYP1B1 metabolizuje širokou škálu polycyklických uhlovodíků a jejich nitroderivátů. Také metabolizuje obdobné substráty jako CYP1A1, například benzo[a]pyren a 17 β -estradiol [58,60-62].

Protein má potvrzených 26 alel [63]. Forma genu *CYP1B1**2 je rychleji přepisována do mRNA [64]. Forma *CYP1B1**3 je zase více inducibilní oproti přirozené formě. Protein vzniklý z tohoto genu navíc nese mutaci L432V která může vést ke zvýšené aktivitě [65]. Změna aminokyseliny způsobuje i snížení stability, což je např. i případ alely *CYP1B1**4, kde je vzniklý protein obsahující mutaci A453V rychle degradován proteasami [66].

1.3.4 Aktivní centrum cytochromů P450 rodiny 1

Všechny tři proteiny ve své struktuře obsahují kavitu, jejíž „dno“ tvoří molekula hemu. Velikost i tvar kavity je u proteinů podobné. Podobnost aktivního centra CYP1A1 je ale větší pro CYP1B1, než pro CYP1A2 což je dáno pozorovanou pozicí proteinových řetězců okolo aktivního centra. Model kavity a její pozici vůči některým aminokyselinám v blízkosti aktivního centra ukazuje obrázek 9 (strana 27).



Obr. 9 Proložení aktivních míst proteinů rodiny CYP1

Zobrazena jsou rezidua CYP1A1 (tyrkysová), CYP1A2 (černá) a CYP1B1 (růžová). Kavita je zobrazena jako šrafovaný objekt. Postranní řetězce nekonzervovaných reziduů jsou zobrazeny tyčkovými modely, ostatní rezidua jsou zobrazeny linkami. Hvězdičky ukazují na rezidua, jejichž změna by mohla vyvolat změny v aktivitě proteinů; převzato z [67].

Vazebná kavita je obklopena více než dvaceti aminokyselinami. Jejich úplné srovnání u tří členů rodiny CYP1 bylo popsáno po získání struktury posledního z nich. Podobnost proteinů CYP1A1 a CYP1B1 je patrná i v jejich katalytických vlastnostech. Oba jsou aktivnější v O-deethylaci ethoxyresorufinu než CYP1A2, který je ale zase více aktivní v podobné přeměně methoxyresorufinu [68].

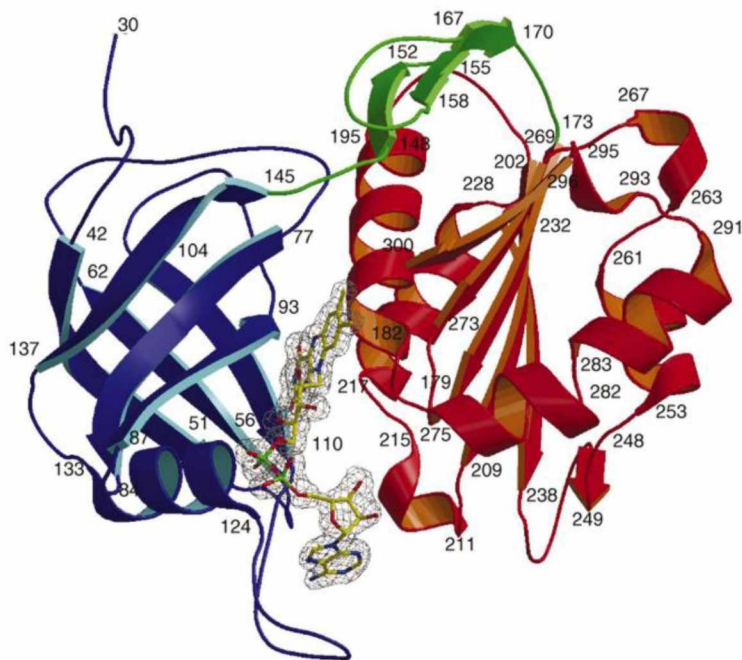
1.4 NADH:cytochrom b_5 reduktasa 3

Tento enzym (CYB5R3) přenáší elektrony z NADH na cyt b_5 a katalyzuje tak jednoelektronovou redukci ferricytochromu b_5 na ferrocycytochrom b_5 . Protein se vyskytuje ve dvou isoformách, a to solubilní a membránové formě. Solubilní isoforma obsahuje katalytickou doménu, zatímco membránová isoforma má na N-konci navíc membránovou kotvu. Oba proteiny jsou produkovány z jednoho genu, solubilní forma vzniká z transkriptu postrádajícího první exon [69].

Membránová forma má významnou funkci v řadě procesů, například při syntéze cholesterolu, prodlužování mastných kyselin a detoxikaci xenobiotik [70-72].

Solubilní forma se vyskytuje v cytoplasmě erythrocytů a její funkcí je redukce methemoglobinu. Bylo popsáno přes čtyřicet možných mutantních forem, z nichž některé mohou způsobit methemoglobinemii [69].

Struktura solubilní lidské CYB5R3 byla získána pomocí krystalografické analýzy proteinu připraveného heterologní expresí v bakteriích [73]. Model ukazuje obrázek 10.



Obr. 10 Struktura lidské solubilní CYB5R3

Na obrázku jsou zachyceny i pozice aminokyselin. Modrá část představuje doménu vážící FAD, červená část doménu vážící NADH, zelená část představuje spojující sekvenci mezi oběma doménami. Model látky mezi doménami představuje molekulu FAD; převzato z [73].

Molekula CYB5R3 sestává ze dvou domén a to z N-terminální domény vážící FAD a C-terminální domény vážící NADH. Domény jsou spojeny malou „linkerovou“ sekvencí.

Existuje několik publikací zabývajících se interakcemi aminokyselin cyt b_5 a CYB5R3. Jako aminokyseliny cyt b_5 důležité pro interakci jsou označovány E42, E43, D58, E64, a D71 [74, 75].

1.5 Cytochrom b_5

Tento relativně malý hemoprotein (cca 17 kDa) objevený koncem 40. let 20. století se vyskytuje v mnoha tkáních a jako přenašeč elektronů se účastní celé řady reakcí, mezi něž například patří desaturace mastných kyselin, redukce methemoglobinu na hemoglobin

a biosyntéze cholesterolu [71-78]. Zapojuje se také do biochemické přeměny léčiv a jiných xenobiotik díky interakcím s formami cytochromu P450 [79].

1.5.1 Formy savčího cytochromu b₅

Cytochrom b₅ se u savců vyskytuje ve třech formách:

- membránová forma (označena cytochrom b₅ typ A) je lokalizována na cytoplazmatické straně endoplazmatického retikula [80]. Lidský protein má délku 134 aminokyselin. Pro potřeby disertační práce je tato forma označena cyt b₅.
- solubilní cytosolární forma, která se nachází především v erytrocytech a je zapojena do redukce methemoglobinu na hemoglobin [77]. Lidská forma se skládá z 98 aminokyselin.
- druhá membránová forma (označena cytochrom b₅ typ B), která je lokalizována na vnější membráně mitochondrií [81]. Tato forma se u lidí skládá ze 146 aminokyselin.

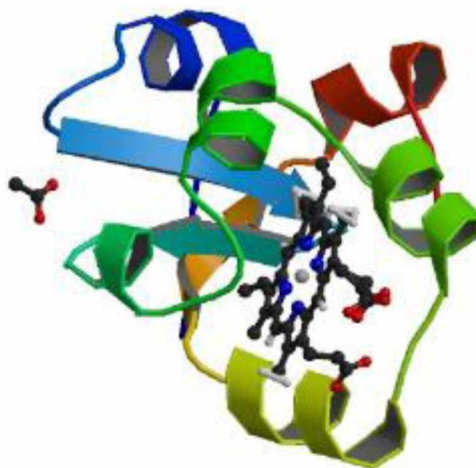
Membránové formy cytochromu b₅ jsou exprimovány v mnoha tkáních zahrnujících játra, ledviny, plíce, mozek a slezinu [82-84].

1.5.2 Struktura cytochromu b₅

Membránový protein vyskytující se na endoplazmatickém retikulu, tedy forma A, má kyselé charakter. Sestává ze šesti α -helixů a pěti β -listů, které jsou sbaleny do tří odlišitelných domén [85-87]:

- N-terminální solubilní katalytickou doménu sestávající přibližně z 90 aminokyselin obsahující hem.
- Část spojující membránovou kotvu a spojující doménu.
- C-terminální membránovou kotvu, která obsahuje 28 aminokyselin, z nichž 23 aminokyselin tvoří hydrofobní oblast. Ačkoliv její struktura není známa, nejspíše tvoří helix procházející membránou.

Pomocí rentgenostrukturní analýzy byl relativně nedávno sestaven model prasečí solubilní formy cytochromu b₅ typu A, která je z 87 % stejná jako lidská forma [88]. Tento model získaný s vysokým rozlišením je ukázán na obrázku 11 (strana 30).



Obr. 11 Struktura prasečí solubilní části mikrosomálního cytochromu b₅
Převzato z [88].

Protein je druhově vysoce konzervován a vykazuje mezi savci identitu přesahující 80%. O kyselém charakteru vypovídá to, že ze 134 aminokyselin je 23 kyselin glutamových nebo asparágových [89].

Hem je lokalizován v hydrofobní kapse a ion železa hemu je koordinován dvěma axiálními ligandy, evolučně konzervovanými aminokyselinami histidin na pozicích 44 a 68. Okraje hemu jsou vystaveny buněčnému prostředí. Koordinace histidiny zabraňuje iontu železa přímou interakci s molekulami kyslíku. I tak je ale protein schopen přenosu elektronů mezi reduktasami a oxidačními enzymy [90, 91].

1.6 Vliv cytochromu b₅ na cytochromy P450

Cytochrom b₅ může být redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou a zapojovat se tak do reakcí katalyzovaných cytochromem P450. To bylo poprvé ukázáno počátkem 70. let 20. století [90]. Bylo také prokázáno, že cytochrom b₅ ve spojení se svým partnerským proteinem, NADH:cytochrom b₅ reduktasou, může efektivně přenášet elektrony na CYP bez přítomnosti CPR [92-94]. Efekt přítomnosti cyt b₅ je ale vysoce závislý na sledovaných reakčních podmínkách a přítomnost tohoto proteinu může reakci stimulovat, inhibovat nebo být vůči reakci zcela neutrální [85, 95]. Efekt na sledované reakce vykazuje pouze membránová forma cytochromu b₅, solubilní forma tento vliv nevykazuje [96, 97].

Existuje více teorií o mechanismu vlivu cytochromu b_5 , přičemž se uvažuje o možné kombinaci níže zmíněných teorií:

- Urychlení přenosu druhého elektronu k cytochromu P450 – reakční cyklus cytochromu P450 vyžaduje dodání dvou elektronů. Elektrony může poskytnout nejen CPR, ale také cyt b_5 [98].
- Stablnější propojení přenosu elektronů s cytochromem P450 – přidání cyt b_5 snižuje produkci nechtěných produktů reakci, tedy superoxidových aniontů, a naopak vede ke zvýšení produkce požadovaných produktů [99, 100]. Cyt b_5 může stabilizovat mezikrok reakčního cyklu a snižovat tak produkci superoxidové aniontu [101].
- Tvorba komplexu schopného přijmout dva elektrony – cyt b_5 s cytochromem P450 tvoří komplex. Po jedné redukci provedené CPR převezme cyt b_5 ihned elektron od cytochromu P450 a ten je tak schopen téměř okamžitě přijmout druhý elektron od CPR. Během reakčního cyklu tak cyt b_5 dodá druhý elektron velmi rychle v rámci komplexu [101].
- Strukturní vliv cyt b_5 – změna struktury cytochromu P450 daná vazbou cytochromu b_5 . Apoforma cytochromu b_5 , tedy forma bez hemu je totiž schopna podporovat vybrané reakce vybraných cytochromů P450. Z toho se usuzuje na možnost ovlivnění bez redoxních změn [102, 103]

1.6.1 Vliv cyt b_5 na CYP3A4

V případě koexprimovaných proteinů CYP3A4, CPR a cyt b_5 lokalizovaných v membránách bakterií byla aktivita CYP3A4 vůči nifepidinu zvýšena o 160 %. Koexprese cytochromu b_5 vedla také k vyšší životnosti CYP3A4 [104].

Stimulace aktivity proteinu vůči nifepidinu a také vůči testosteronu byla po přidavku cytochromu b_5 pozorována i v koexpressním systému CPR-CYP v bakteriálních membránách i membránách hmyzího endoplasmatického retikula [105].

Později byly provedeny experimenty s činidly způsobujícími „cross-linking“ proteinů, kdy byly vzniklé heterodimery proteinů CYP3A4 a cytochromu b_5 analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Zajímavostí bylo použití holoformy a apoformy cytochromu b_5 , kdy byly sledovány interakce apoformy b_5 . U této formy bez hemu byly totiž prokázány podobné stimulační účinky jako u formy proteinu s hemem. Výsledky

naznačily, že obě formy cytochromu b_5 se váží na podobné pozice na CYP3A4. Pozice spojené pomocí činidel byly identifikovány jako E56 cytochromu b_5 a K96/K127 cytochromu P450. Dalším navrženou interakcí byla proměnlivá dvojice E37/E43 cytochromu b_5 a K421 cytochromu P450 [106]. Další studie však naznačují, že apoforma cyt b_5 aktivitu CYP3A4 s protinádorovým léčivem ellipticinem jako substrátem nestimuluje [107].

Později byla ukázána i důležitost dalších kyselých reziduí cytochromu b_5 vůči CYP3A4. Při sledování přeměny progesteronu a testosteronu byla významně snížena stimulace mutantními formami cytochromu b_5 nesoucích mutace E48G, E49G, D58G, D65G a také v mutantech nesoucích dvojité mutace v blízkých zmíněných pozicích. Podobné výsledky poskytla analýza produktů chemického síťování [108].

1.6.2 Vliv cyt b_5 na CYP17A1

Cytochrom P450 17A1 katalyzuje reakce hormonální biosyntézy. Jedna z jeho reakcí, 17,20-lyasová reakce je velmi ovlivňována přítomností cytochromu b_5 , kdy dochází až k 10-násobnému navýšení aktivity enzymu.

Podle experimentů provedených v systému mikrosomů kvasnic s přidanými formami rekombinantního lidského cytochromu b_5 lze za hlavní aminokyseliny cytochromu b_5 k regulaci výše zmíněné reakce považovat kyselá rezidua E48 a E49 a bazické reziduum R52. Navíc, společná mutace rezidui E48G a E49G v enzymu vyvolala pokles modulace o 95%, což naznačuje na důležitost celého kyselého úseku [109].

Pomocí chemického síťování bylo dosaženo spojení heterodimerů CYP17A1 a cytochromu b_5 zatímco dvojitý mutant E48G + E49G žádný heterodimer neposkytl. Díky hmotnostní spektrometrie byly identifikovány dvojice spojených reziduí v obou proteinech. Jako kontaktní rezidua byly označeny aminokyseliny K88, R347 a R358/R449 proteinu CYP17A1 ve spojení s E61, E52 a E48/E49 cytochromu b_5 [110].

Podobná rezidua byla nalezena jako důležitá také pomocí molekulárního modelování. Podle výsledků této studie se vazebný povrch skládá z aminokyselin E48, E49, E42 a D65 cytochromu b_5 interagujících s rezidui cytochromu P450 17A1, jmenovitě S427, R358, R347 a K88. Molekulární modelování oproti hmotnostní spektrometrii navrhlo spojení E49 a S427 [111].

1.6.3 Vliv cyt b₅ na CYP2E1

Cytochrom b₅ stimuluje CYP2E1 v řadě jeho reakcí, například ve významné přeměně acetaminofenu (paracetamolu) na toxický metabolit N-acetyl-p-benzochinon imin, kdy je reakce jeho přítomností zvýšena až 25-krát. Oproti například CYP3A4 nelze v této přeměně a ani řadě dalších nahradit holoformu cytochromu b₅ za apoformu [112].

Interakční povrch cytochromu b₅ a CYP2E1 byl prozkoumán technikou chemického síťování, kdy byly získané heterodimery analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Byly tak nalezeny dva možné interakce, kdy první je to mezi rezidui D53 (cyt b₅) a K428 cytochromu P450 a druhé E56 (cyt b₅) a K434. Významnost dvou identifikovaných reziduí na povrchu CYP2E1 byla prokázána i místně cílenou mutagenezí, kdy u mutantních forem proteinu s mutovanou jednou nebo oběma pozicemi došlo ke snížení stimulace cytochromem b₅ [113].

Později byla ukázána i důležitost jiných reziduí na povrchu cytochromu b₅. Pomocí sledování aktivity CYP2E1 a jeho stimulace mutantními formami cytochromu b₅ byl prokázán vliv aminokyselin D58 a D65. Porovnání bylo prováděno v systému DLPC liposomů a také v prostředí kvasničných mikrosomů. V obou případech byla experimentálně prokázána snížená stimulace mutantními formami se zmíněnými mutacemi [114].

1.6.4 Vliv cyt b₅ na cytochromy P450 podrodiny CYP1A

Role cytochromu b₅ v ovlivnění lidských cytochromů P450 podrodiny 1A není stále dostatečně objasněna a některé výsledky dokonce naznačují, že k signifikantnímu ovlivnění vůbec nedochází. Tyto odlišné výsledky mohou být dány rozdílností systémů použitých k experimentům a také rozdílností sledovaných reakcí majících za cíl porovnat aktivitu systému.

Zajímavým pokusem bylo sledování aktivity osmi proteinových variant CYP1A2 vycházejících z různých alel a sledovaných v koexpresním systému CYP-CPR-cyt b₅ v bakteriích. Aktivita byla stanovena proti osmi substrátům enzymu a porovnána proti aktivitám přirozené „divoké formy“. Studie naznačuje, že cytochrom b₅ umožňuje variantám přiblížit se chování „divokého“ enzymu a vystupuje tedy jako prostředník opravující nedostatky mutantních alel. Studie dále naznačuje možnost interakce rezidua G299 s CPR A cyt b₅ [115].

Další studie porovnávala vliv potkaní a lidské formy cytochromu b_5 na CYP1A2 a 2E1. Ačkoliv výsledky ukázaly, že stimulační vlastnosti cytochromu b_5 vůči CYP2E1 jsou podobné, u CYP1A2 nebyla prokázána stimulace přeměny 2-aminoantracenu přítomností lidské membránové formy cytochromu b_5 [116].

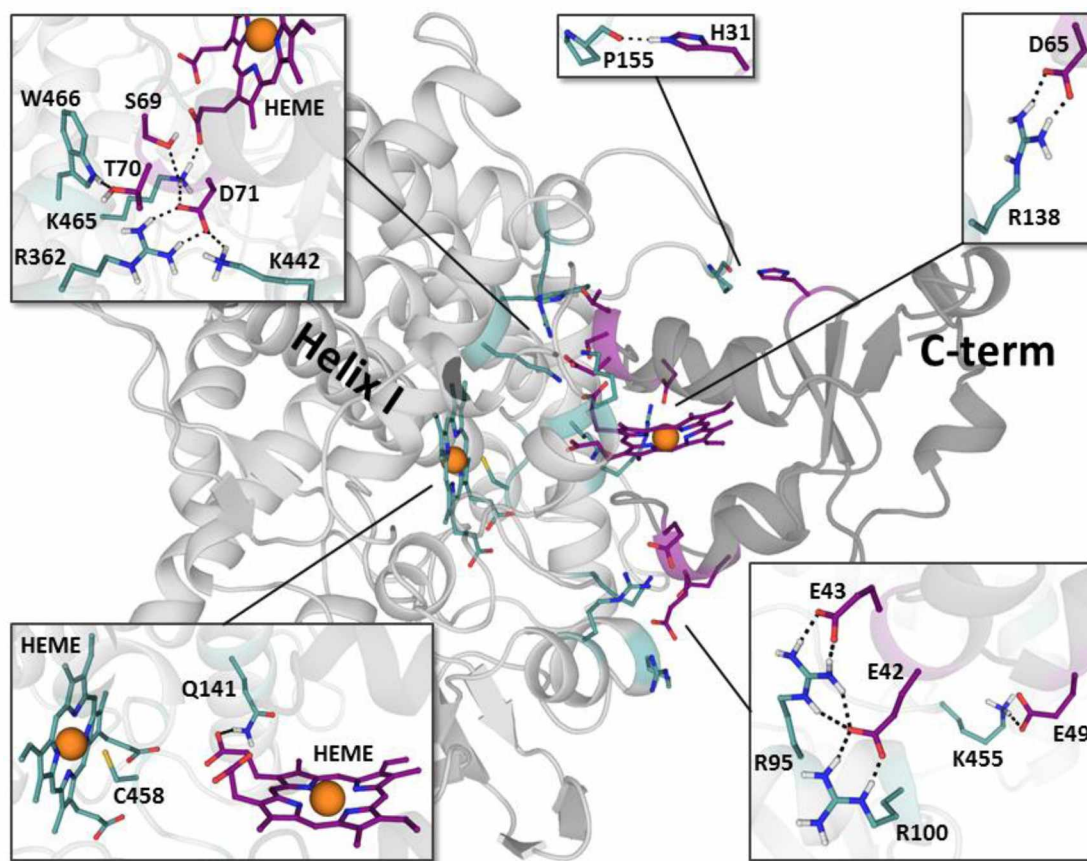
Aktivita enzymů z podrodiny CYP1A byla stanovena v koexpresním systému bakteriálních membrán a membrán hmyzích buněk stanovená pomocí O-deethylace ethoxyresorufinu byla po přidání cytochromu b_5 v poměru 1:1 podobná jako bez přidání tohoto proteinu. Velmi podobně dopadlo stanovení aktivity tohoto enzymu pomocí 7-ethoxycoumarin-O-deethylace. Aktivita CYP1A2 stanovená pomocí 7-ethoxycoumarinu také nevykazovala změny oproti systému bez cytochromu b_5 . Dle aktivity proti fenacetinu došlo v systému bakteriálních membrán dokonce k mírnému poklesu [105].

K zajímavějším výsledkům vedly experimenty s modelovým protirakovinným léčivem ellipticinem v systému potkaních mikrosomů, tedy fragmentů membránového retikula. Metabolismus byl studován také v rekonstituovaném systému skládajícím se z potkaního rekombinantního CYP1A1 nebo králíčího CYP1A2, dále z králíčího rekombinantního cytochromu b_5 a králíčí CPR.

Přidání cytochromu b_5 do rekonstituovaného systému sestávajícího z jednotlivých izolovaných enzymů vedlo ke změně zastoupení jednotlivých metabolitů léčiva a také ke zvýšení tvorby aduktů ellipticinu s DNA. Byla také ukázána závislost efektu na přítomnosti hemu v cytochromu b_5 [117].

Nárůst metabolismu tohoto léčiva a také formace aduktu byl pozorován i u tkáňových kultur hepatocytů [118].

Dalším studovaným substrátem byl karcinogenní benzo[a]pyren. S použitím stejných systému zmíněných výše bylo ukázáno, že přidání pětinasobného množství cytochromu b_5 proti CYP1A1 vede ke dvojnásobnému zvýšení metabolismu [119, 120]. Podobných výsledků bylo dosaženo dodáním králíčího cytochromu b_5 k systému mikrosomů hmyzích buněk obsahujících lidský rekombinantní CYP1A1. Překvapivě ale nedošlo k navýšení metabolismu u stejného proteinu exprimovaného v bakteriálních membránách [121].



Obr. 12 Detailní pohled na možný kontakt mezi lidským cytochromem b_5 a CYP1A2 získaný pomocí molekulového modelování.
Převzato z [122].

Odlišný přístupem bylo použití molekulárního modelování k průzkumu možných interakčních partnerů na površích lidského cytochromu b_5 a CYP1A2. S využitím homologního lidského modelu cytochromu b_5 založeném na hovězí formě byly pomocí metod molekulového modelování ukázány možné interakční členy (obrázek 12) skládající se z kyselých aminokyselin cytochromu b_5 a bazických aminokyselin CYP1A2 [122].

2. Cíle disertační práce

Cíle práce lze rozdělit do tří oblastí:

A) cílem první části disertační práce bylo pomocí kombinace experimentu a molekulárního modelování ověřit hypotézu, že by bakteriální flavodoxin mohl zodpovídat za redukci lidských membránových cytochromů P450 v intaktní bakteriální buňce během jeho heterologní exprese.

B) cílem druhé části práce bylo prostudovat roli aminokyselin s hydroxylovou skupinou v postranním řetězci přítomných v aktivním centru cytochromů P450 rodiny 1 na redukční aktivaci aristolochové kyseliny I katalyzovanou těmito enzymy. Tato práce měla za úkol potvrdit hypotézu učiněnou na základě předchozích teoretických studií popisujících vazbou aristolochové kyseliny do aktivního místa cytochromu P450 rodiny 1.

C) cílem třetí části práce bylo poznání a potvrzení vlivu lidského membránového cytochromu b_5 na aktivitu lidských membránových cytochromů P450 1A1 a 1A2 v přítomnosti CPR nebo CYB5R3.

K dosažení cílů bylo nutné provést následující kroky:

- Získání plasmidů nesoucích geny pro cytochromy P450 1A1, 1A2, 1B1 a jejich mutantů, dále pro NADPH: cytochrom P450 reduktasy a NADH: cytochrom b_5 reduktasy
- Heterologní příprava cytochromů P450 1A1, 1A2, 1B1 a jejich mutantů, NADPH: cytochrom P450 reduktasy a NADH: cytochrom b_5 reduktasy
- Sledování množství redukovaných cytochromů P450 v bakteriálních buňkách
- Sledování ovlivnění aktivity cytochromů P450 rodiny 1 se záměnou daného aminokyselinového rezidua
- Studium ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti cytochromu b_5
- Studium ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b_5
- Studium vlivu aktivity mutantních cytochromů P450 v přítomnosti cytochromu b_5
- Studium ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti NADH:cytochrom b_5 reduktasy a cytochromu b_5

3. Materiál a metody

Přístroje:

Centrifugy

Centrifuge 5415 R

Allegra X-22R

Ultracentrifuga Optima LE-80K

Janetzki K70D

Eppendorf

Beckman Coulter

Beckman Coulter

MLW

HPLC:

Agilent 1200 Series s DAD detektorem

Elektroforetická aparatura

Mini-PROTEAN Tetra cell

MSMINI 10-Multi Sub Mini

BIO-RAD

Uvitec

Zdroj pro elektroforézu

EPS 301

Amersham Pharmacia Biotech

Inkubátory

IR 1500 Automatic CO2 Incubator

G24 Environmental Incubator Shaker

Multitron Pro

Multitron Standard

Flow Laboratories

New Brunswick Scientific Edison

Infors HT

Infors HT

Spektrofotometr

Cary 60 UV-Vis

Spekol 11

Specord 250 Plus

Specord M40

Agilent

Carl Zeiss

Carl Zeiss

Carl Zeiss

Fluorescenční spektrofotometr

LS55

Perkin Elmer

Ultrazvukový homogenizátor

Sonopuls HD 3100, sondy KE 76 a MS 73 Bandelin

Termocycler

Tech gene Techne

Materiál:

Sigma

Kanamycin sulfát, riboflavin, oligonukleotidy, phenacetin, acetanilid, paracetamol, α -naftoflavin, aristolochová kyselina I, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, resorufin

Serva

akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dodecylsulfát sodný, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 2-merkapt ethanol, lysozym z vaječného bílku, Coomassie Brilliant Blue R-250, ampicilin (sodná sůl),

Geneaid

Geneaid Plasmid Mini Kit

Invitrogen

SYBR Safe DNA gel stain

Lachema

citrát železitý, chlorid zinečnatý, chlorid kobaltnatý hexahydrát, molybdenan sodný dihydrát, chlorid vápenatý, chlorid měďnatý dihydrát, kyselina boritá, dithioničtan sodný, EDTANa₂ (chelaton 3), chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, fosforečnan draselný, fosforečnan didraselný,

New England Biolabs

Q5 DNA polymerasa, restrikční endonukleasy, T4 DNA ligasa

Thermo

Pfu DNA polymerasa, 2-Log DNA marker, PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder

Penta

Methanol, glycin, acetonitril

GE Healthcare

DEAE Sepharosa CL-6B

BIO-RAD

Persíran amonný, Preision Plus Protein Standards

Fisher

Dinukleotidtrifosfáty, IPTG, kvasničný extrakt, trypton, baktopepton, δ -aminolevulová kyselina

Carl-Roth

Imidazol, Triton X-100, CHAPS, Luria Agar

Qiagen

Ni-NTA Superflow resin

Plasmidy

pET22b	Novagen; získán od RNDr. Marka Ingra, Ph.D.
pET28a	Novagen; získán od Mgr. Jana Bláhy
DH5a	získány od RNDr. Daniela Rozbeského, Ph.D.
JM109	Promega, získány od RNDr. Daniela Rozbeského, Ph.D.
JM109 (DE3)	Promega

C41 (DE3) Lucigen

Geny

Cyt b ₅	Vložen v plasmidu pET22b, připraven na katedře biochemie Mgr. Terezou Hálkovou
CYP1A1 a CYP1A2	laboratoř prof. Guengeriche, Nashville, USA
CPR	laboratoř prof. Szklarz, Morgantown, USA
CYB5R3	DNASU databáze
CYP1B1, CYP2B6	Harvard PlasmID databáze
CYP2D6, CYP2C8	Harvard PlasmID databáze

3.1 PŘÍPRAVA PLASMIDŮ

V rámci předkládané práce byla připravena řada expresních plasmidů, které byly připraveny pomocí klasických metod molekulární biologie. Proto obecný postup přípravy plasmidu uvádím v této kapitole.

Prvním krokem bylo provedení polymerasové řetězové reakce. Ta slouží k přípravě velkého množství DNA z původního templátu. V průběhu práce byla použita pro úpravy genů.

Reakční směs pro PCR genů obsahovala následující složky. V závorkách jsou uvedeny koncentrace zásobních roztoků:

- 1 µl templátu, 10x ředěného originálního plasmidu
- 1 µl forward primeru (20 µM)
- 1 µl reverse primeru (20 µM)
- 1 µl směsi dinukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 5 µl pufru pro Pfu DNA polymerasu (10x koncentrovaný)
- 6 µl MgSO₄ (25 mM)
- 2 µl dimethylsulfoxidu (DMSO)
- 0,5 µl Pfu polymerasy
- Sterilní voda (do celkového objemu 50 µl)

DMSO zde sloužil jako „enhancer“ polymerasové řetězové reakce. Reakce byla provedena v termocykleru Techne v následujícím programu, který byl navržen dle návodu

výrobce použité DNA polymerasy. Teplota pro nasednutí primerů byl jedinou velkou odlišností pro každou dvojici primerů. Tato teplota se pohybovala v rozmezí 53-60 °C.

Doba polymerace byla volena dle předpokládané délky produktu s poskytnutím časové rezervy. Například u reakce s CYP1A1 o velikosti cca 1500 bp byla doba polymerace nastavena na 4 minuty.

30 cyklů

- 95 °C 30 s : rozvolnění DNA
- Tm-5 30 s : nasednutí primerů
- 72 °C 2 min/kb : polymerace

1 cyklus

- 72 °C 10 min : dosyntetizování úseků DNA
- 4 °C : do odebrání vzorků

Vzniklé produkty byly přečištěny pomocí agarosové elektroforesy a izolovány z agarosového gelu pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit metodikou výrobce. Získané izoláty byly podrobeny restrikci pomocí dvojice restrikčních endonukleas po dobu 2 hodin.

Ke štěpení byla připravena směs v následujícím pořadí:

- 16 µl izolátu
- 2 µl NEBuffer, typ dle manuálu výrobce
- 1 µl restrikční endonukleasy NdeI (20 u/µl)
- 1 µl restrikční endonukleasy HindIII (20 u/µl)

Po restrikci byly izoláty znovu přečištěny skrze agarosovou elektroforesu a znovu izolovány z agarosového gelu. Následně byly izolované fragmenty ligovány do příslušného plasmidu, který byl naštěpen stejnými restrikčními endonukleasami.

K ligaci byla připravena obecná směs v následujícím pořadí.

- 10-12 µl štěpeného genu
- 5-7 µl štěpeného plasmidu
- 2 µl 10X T4 DNA Ligase Buffer
- 1 µl T4 DNA ligasa

Ligace probíhala 2-4 hodiny při 16 °C, poté byla transformována do buněk *Escherichia coli* kmene DH5 α . Po jejich nanesení na LB agarové plotny s příslušným antibiotikem a inkubování při 37 °C přes noc byla z plotny odebrána jedna kolonie. Ta byla pěstována v 10 ml tekutého LB médiu s příslušným antibiotikem. Následně byl vektor izolován pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit dle návodu výrobce. Struktura vzniklého plasmidu byla ověřena zpětným vyštěpením vloženého fragmentu na agarosové elektroforese a následně byla provedena sekvenace DNA v servisním centru PŘF UK na Viničné 7.

3.1.1 Příprava expresních plasmidů pro CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1

Lidské geny *CYP1A1* a *CYP1A2*, oba zaklonované v separátních plasmidech pCW byly získány darem od prof. P.F. Guengeriche ze spolupracujícího pracoviště z Vanderbilt University z USA. Tyto plasmidy byly využity jako templáty pro řetězovou polymerasovou reakci, při které došlo k dodání sekvence šesti kodónů CAT na 3-konec sekvence genu. Při expresi se na C-konci proteinu nachází šestice histidinů, které tvoří histidinovou purifikační kotvu použitelnou na afinitní chelatační chromatografii.

Gen *CYP1B1* byl získán z Harvard PlasmID databáze (klon MGC:19842). Opět byla provedena úprava genu dodáním histidinové kotvy do stejné pozice jako u předchozích genů.

Dále byla provedena změna stop-kodónů. Původní lidský gen CYP1A1 totiž nese stop-kodón TAG (označovaný jako „amber“). Produkce byla ale prováděna v bakteriálním kmenech schopných suprese tohoto stop-kodónu se schopností vložení glutaminu na místo kódované kodonem „amber“ (suprese značena jako glnV44). To dává kmeni vyšší procentuální pravděpodobnost možnosti porušení čtecího rámce genu. Proto byla na konec genů dodána sekvence TAATGA obsahující dva silnější stop-kodóny.

Použité primery nesly sekvence restričních endonukleas NdeI a HindIII, pomocí nichž byly poté vloženy do plasmidu pCW.

K úpravě genů byly použity primery (tabulka 3, následující strana); forward primery při reakci nasedali na 5'-konec genu a sekvenci buď neměnily nebo ji v případě CYP1B1 modifikovaly, reverse primery byly nositelem výše popsaných změn.

Tab. 3 Primery použité k úpravě genů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1

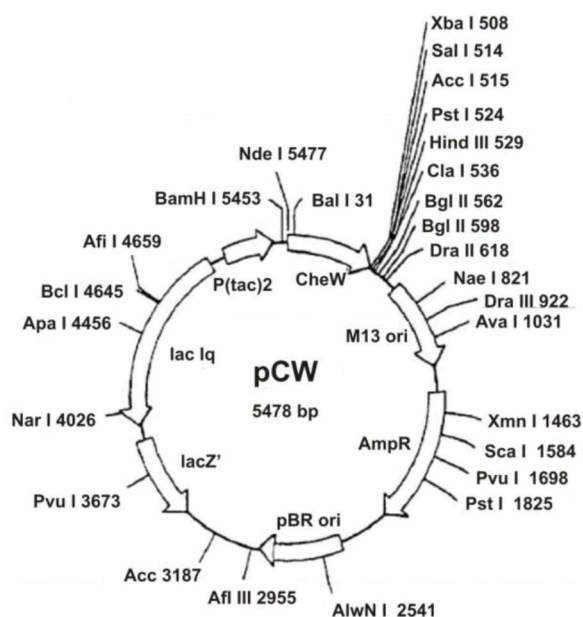
Název	Sekvence
1A1-forv	5'-GAATTCATATGGCTTTTCCAATTTCAATG-3'
1A1-rev	5'- TATCTAAGCTTCATTAATGATGATGATGATGATGAGAGCGCAGCTGC ATTTG-3'
1A2-forv	5'-GAATTCCATATGGCTCTGTTATTAGCAG-3'
1A2-rev	5'- TATCTAAGCTTCATTAATGATGATGATGATGATGATTGATGGAGAAG CGCAG-3'
1B1-forv	5'- GACGAATTCATATGCTTTCTCCAAATGATCCATGGCCGCTAAACCCG -3'
1B1-rev	5'- GCCAAGGAAACTTGCCAACATCATCATCATCATTAATGAAGCTT AGATA-3'

Mapa plasmidu pCW je ukázána na obrázku 13 (strana 44). Mezi části plasmidu patří:

- AmpR - gen kódující enzym β -laktamasu propůjčující hostující bakterii rezistenci proti ampicilinu a příbuzným antibiotikům, například carbenicilin
- Expresní promotory, z nichž plasmid disponuje dvojicí hybridních promotorů *tac* a jim představeným promotorem lacUV5. Funkce těchto promotorů není závislá na přítomnosti cyklického AMP a je řízena podobným mechanismem jako původní bakteriální laktosový promotor. Běžný způsob aktivace exprese je přidání isopropyl- β -D-1-thiogalaktosidu (IPTG), neštepitelného derivátu laktosy.
- Ostatní části plasmidu zahrnují gen lac Iq omezující předčasnou aktivaci promotorů; počátek replikace plasmidu označený jako pBR ori; téměř nepoužívanou entitu M13 ori a poslední, ze struktury plasmidu nepoužitelnou entitu lacZ

Gen CheW ukázaný na obrázku nebyl v používaných konstruktech přítomen, jelikož byl nahrazen geny pro CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1.

Detaily metod jsou rovněž popsány v příloze č. 3, která je součástí disertační práce.



Obr. 13 Mapa plasmidu pCW
Převzato z [123].

3.1.2 Příprava expresních plasmidů pro ostatní cytochromy P450

Lidské geny *CYP2B6*, *CYP2D6*, *CYP2C8* zaklonované v různých plasmidech byly získány z Harvard PlasmID databáze a lidský gen *CYP2S1* zaklonovaný v plasmidu pCW byl získán darem od prof. P.F. Guengeriche z Vanderbilt University z USA. Plasmidy prvních tří proteinů byly využity jako templáty pro řetězovou polymerasovou reakci, při které došlo k dodání sekvenční šesti kodónů CAT na 3-konec sekvenční genu. Při expresi se na C-konci proteinu nachází šestice histidinů, které tvoří histidinovou purifikační kotvu použitelnou na afinitní chelatační chromatografii.

Dále byla provedena změna stop-kodónů, stejně jako u genů rodiny CYP1. Použité primery nesly sekvenční restriktčních endonukleas NdeI a HindIII, pomocí nichž byly poté vloženy do plasmidu pCW. Některé z genů ale ve své sekvenční obsahovaly štěpící místa pro tyto endonukleasy, a proto určené primery obsahovaly sekvenční pro odlišné enzymy. Bylo tak využito endonukleas BamHI a XhoI, pomocí nichž byly geny vloženy do plasmidu pCW.

K úpravě genů byly použity primery (tabulka 4, následující strana); forward primery při reakci nasedali na 5-konec genu a modifikovaly sekvenční, reverse primery byly nositelem histidinového tagu.

Tab. 4 Primery použité k úpravě genů CYP2B6, CYP2D6 a CYP2C8

Název	Sekvence
2B6-forv	5'- GAATTCATATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTCTTGCACTCCTCACAG GAC -3'
2B6-rev	5'- GCTTCCTGCCCCGCCATCATCATCATCATTAATGACTCGAGAGA TA -3'
2D6- forv	5'- AGTAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGTCATATGGCTCTTGAAGCACT TGTACCACTGGCCGTGATAGTGGC -3'
2D6-rev	5'- GTGCTGTGCCCCGCCATCATCATCATCATTAATGAAGCTTAGAT A -3'
2C8-forv	5'- GAATTCATATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTCTGGGTCTCTCCTGTT TGCTTCTCCTTTCACTCTGGAGAC -3'
2C8-rev	5'- GCTTCATCCCTGTCCATCATCATCATCATTAATCTAGAAGCTTA AGATA -3'

Detaily metod pro přípravu CYP2S1 jsou rovněž detailně popsány v příloze č. 4 disertační práce [124].

3.1.3 Příprava expresního plasmidu pro lidský cytochrom b₅ (cyt b₅)

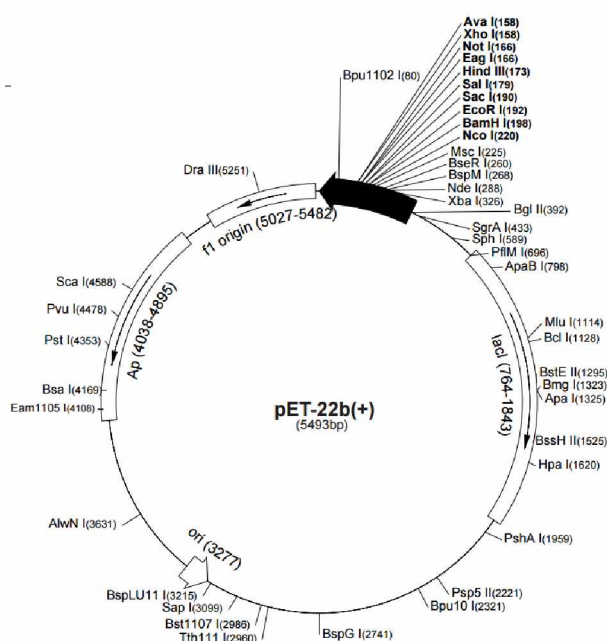
Pro snadnější izolaci lidského cytochromu b₅ a především jeho mutantů bylo nutné přidat histidinovou kotvu. Jelikož se ale jedná o protein s membránovou kotvou na C-konci sekvence, byla kotva přidána na jeho N-konec. Změny byly provedeny dle [96], kdy byla jako histidinová značka použita sekvence o minimální nutné délce čtyř histidinů. Mezi sekvencí kódující histidiny a počáteční kodón methioninu byl pomocí primerů (tabulka 5) přidán kodón GCT kódující alanin. Ten zlepšuje expresi, stejně jako u CYP1A1.

Tab. 5 Primery použité k úpravě genu cytochromu b₅

Název	Sekvence
b5-forv	5'-GAATTCATATGGCTCATCATCATCACATGGCGGAACAGTCTG-3'
b5-rev	5'-TATCTAAGCTTTTAGTCTTCCGCCATGTAC-3'

Jako templát byl použit plasmid pET-22b s vloženým syntetickým genem membránového cytochromu b_5 bez afinitní značky. Po přípravě byl gen vložen do plasmidu pET22b pomocí restrikčních endonukleas NdeI a HindIII. Mapu použitého plasmidu pET-22b ukazuje obrázek 14. Důležité části plasmidu zahrnuje opět gen kódující enzym pro rezistenci vůči ampicilinu, regulační geny pro funkci promotoru a místo pro počátek replikace samotného plasmidu.

Významnou změnou oproti starším typům plasmidů je přítomnost T7 promotoru. Jeho činnost je založena součinnosti T7 RNA polymerasy, vložené nejčastěji do genomu hostitelské bakterie, a T7 promotoru. Po přidání IPTG dojde nejprve k expresi T7 RNA polymerasy, která skrze spojený promotor provede transkripci genu umístěného pod tímto promotorem. Výhodami tohoto systému je vyšší kontrola předčasné exprese a především specifita a výrazně vyšší rychlost T7 RNA polymerasy. Samotný systém byl ale navržen pro expresi malých a rozpustných proteinů a exprese složitějších může vést k tvorbě inkluzních tělísek [125].



Obr. 14 Restrikční mapa plasmidu pET-22b
Převzato z [126].

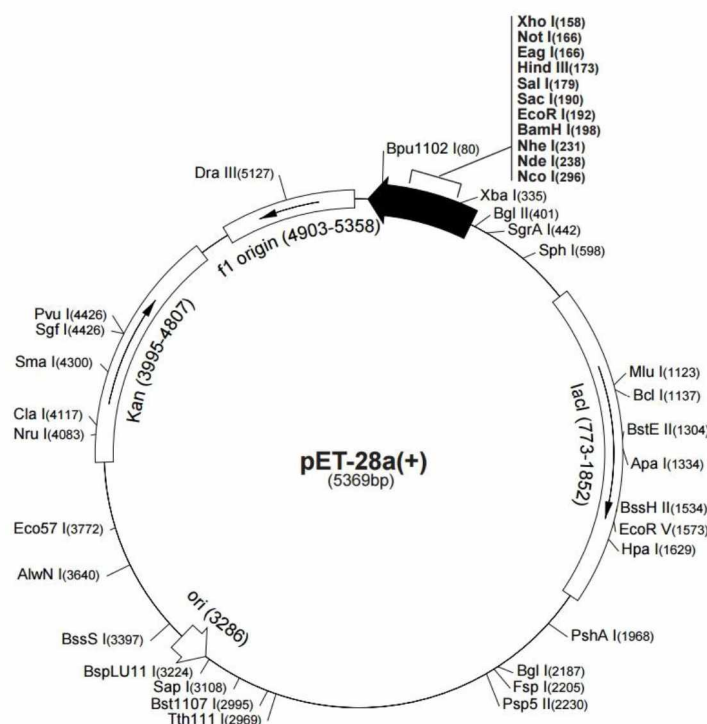
3.1.4 Příprava expresního plasmidu pro lidskou NADH:cytochrom b_5 reduktasu 3 (CYB5R3)

CY5BR3 byl získán z databáze DNASU ve formě genu přítomného na klonovacím plasmidu pENTR223. Ten byl použit jako templát do PCR, která byla nutná pro úpravu genu. Jedná se o membránový protein s membránovou kotvou na N-konci, jenž je ale neschopen produkce v bakteriálním systému. Proto byla membránová kotva delecí prvních 23 aminokyselin odstraněna a nahrazena histidinovou purifikační kotvou. Změna byla provedena „forward primerem“ (tabulka 6).

Tab. 6 Primery použité k úpravě genu cytochromu b_5

Název	Sekvence
b5r-forv	5'-AGATAGAATTCCATATGAAGCTGTTCCAGCGC-3'
b5r-rev	5'-GAGCGCTGCTTCGTCTTCTAAAAGCTTAGATA-3'

Upravený gen byl vložen do plasmidu pET-28a pomocí restrikčních endonukleas NdeI a HindIII. Mapa použité plasmidu je ukázána na obrázku 15. Plasmid používá stejný expresní systém jako popsany pET-22B. Rozdílem je ale přítomnost genu kódující protein pro rezistenci proti kanamycinu.



Obr. 15 Restrikční mapa plasmidu pET-28a
Převzato z [127].

3.2 MÍSTNĚ CÍLENÁ MUTAGENEZE

Touto metodou byly vytvořeny plasmidy nesoucí geny s mutací v dané pozici. Mutagenezi byly podrobeny plasmidy nesoucí gen *cyt b₅*, CYP1A1 a CYP1A2.

Reakční směs pro mutagenezi obsahovala následující složky. V závorkách jsou uvedeny koncentrace zásobních roztoků:

- 1 µl templátu, 10x ředěného originálního plasmidu
- 2,5 µl forward mutačního primeru (10 µM)
- 2,5 µl reverse mutačního primeru (10 µM)
- 1 µl směsi dinukleotidtrifosfátů (10 mM)
- 10 µl HF Phusion pufru (5x koncentrovaný)
- 0,5 µl Phusion DNA polymerasy
- Sterilní voda (do celkového objemu 50 µl)

Reakce byla provedena v termocykleru Techne v následujícím programu, který byl navržen dle návodu výrobce použité DNA polymerasy. Vzhledem k tomu, že při mutagenezi primery nasedají celou délkou sekvenace a jejich teplota tání převyšuje teplotu polymerase, byl použit dvoukrokový protokol s vynecháním teploty pro jejich nasednutí.

Doba polymerace byla volena dle předpokládané délky produktu s poskytnutím časové rezervy. Například u reakce s plasmidem *cyt b₅/pET22B* o velikosti cca 6000 bp byla doba polymerace nastavena na 4,5 minuty.

1 cyklus

- 98 °C 60 s : počáteční denaturace DNA

15 cyklů

- 98 °C 10 s : rozvolnění DNA
- 72 °C 30 s/kb : polymerace

1 cyklus

- 72 °C 10 min : dosyntetizování úseků DNA
- 4 °C : do odebrání vzorků

Do reakční směsi byl přidán 1 µl restriční endonuklasy DpnI (20 u/µl) a následně byla směs inkubována přes noc ve 37 °C. Tato endonukleasa štěpí methylovanou DNA, čímž je zničen původní plasmid izolovaná z bakteriálního zdroje. Nově syntetizovaná

DNA není methylována a je tedy zachována. Po inkubaci bylo 5 μ l směsi použito k transformaci kompetentních buněk XL-10 Gold kompetovaných protokolem dle Innoueho [128]. Po selekci na LB agaru s příslušným antibiotikem byla vybrána jedna kolonie a z té byl izolován plasmid pomocí soupravy High-Speed Plasmid Mini Kit dle návodu výrobce. K ověření mutace byla provedena sekvenace DNA v servisním centru PřF UK na Viničné 7.

3.2.1 Mutagenese lidského genu pro cytochrom b₅

Pomocí protokolu pro místně cílenou mutagenezi) bylo připraveno několik plasmidů nesoucích gen s mutovaným genem pro cytochrom b₅. Všechny mutace byly navrženy tak, aby při expresi proteinu došlo k požadované záměně aminokyseliny. K mutagenezi byly použity primery ukázané v tabulce 7.

Tab. 7 Primery použité k mutagenezi genu cytochromu b₅.

Báze mutující původní gen je vyznačena podtržením v sekvenci forward primeru.

Název	Sekvence
E42Q-forv	5'-CTGACCAAATTCCTG <u>CA</u> AGAACACCCGGGTG -3'
E42Q-rev	5'-CACCCGGGTGTTCTTGCAGGAATTTGGTCAG -3'
E43Q-forv	5'-GACCAAATTCCTGGA <u>ACA</u> ACACCCGGGTGGTG -3'
E43Q-rev	5'-CACCAACCCGGGTGTTGTTCCAGGAATTTGGTC -3'
E42Q, E43Q-forv	5'GTTTACGACCTGACCAAATTCCTG <u>CAACA</u> ACACCCGGGTGGTG AAGAAGTTCTG-3'
E42Q,E43Q- rev	5'CAGAACTTCTTCACCACCCGGGTGTTGTTGCAGGAATTTGGTC AGGTCGTAAAC-3'
E48Q-forv	5'-GAACACCCGGGTGGT <u>CA</u> AGAAGTTCTGCGTG -3'
E48Q-rev	5'-CACGCAGAACTTCTTGACCACCCGGGTGTTTC -3'
E49Q-forv	5'-CACCCGGGTGGTGA <u>ACA</u> AGTTCTGCGTGAACAGG -3'
E49Q-rev	5'-CCTGTTCACGCAGAACTTGTTACACCCGGGTG -3'
E48Q, E49Q-forv	5'CAAATTCCTGGAAGAACACCCGGGTGGT <u>CAACA</u> AGTTCTGCG TGAACAGGCGGGTGGTG-3'
E48Q, E49Q -rev	5'CACCACCCGCCTGTTACGCAGAACTTGTTGACCACCCGGGTG TTCTTCCAGGAATTTG-3'
D58N-forv	5'-GAACAGGCGGGTGGT <u>A</u> ACGCGACCGAAAACCTTCG-3'
D58N -rev	5'-CGAAGTTTTCGGTCGCGTTACCACCCGCCTGTTC-3'
E61Q-forv	5'-GGTGGTGACGCGACCC <u>CA</u> AAACTTCGAAGACG-3'
E61Q-rev	5'-CGTCTTCGAAGTTTTGGGTCGCGTCACCACC-3'
D65N-forv	5'-CGCGACCGAAAACCTTCGAA <u>AA</u> ACGTTGGTCACTCTACCG-3'
D65N-rev	5'-CGGTAGAGTGACCAACGTTTTTCGAAGTTTTCGGTCGCG-3'
V66D-forv	5'-CCGAAAACCTTCGAAGACG <u>A</u> TGGTCACTCTACCGACG-3'
V66D-rev	5'-CGTCGGTAGAGTGACCATCGTCTTCGAAGTTTTTCGG-3'
D71N-forv	5'-GTTGGTCACTCTACCA <u>A</u> CGCGCGTGAAATGTC-3'
D71N-rev	5'-GACATTTACGCGCGTTGGTAGAGTGACCAAC-3'

3.2.2 Mutageneze genů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1

Jelikož získané geny pro CYP1A1 a CYP1B1 nereprezentovali nejrozšířenější alely vyskytující se v populaci, byly příslušné konstrukty opraveny pomocí protokolu pro místně cílenou mutagenezi na jejich přirozenou formu a to pomocí primerů uvedených v tabulce 8.

Tab. 8 Primery použité k mutagenezi genů CYP1A1 a CYP1B1

Báze mutující původní gen je vyznačena podtržením v sekvenci forward primeru.

Název	Sekvence
1A1-fcor-I171L	5'-GAGGCTGAGGTCCTG <u>G</u> TAAGCACGTTGCAGG-3'
1A1-rcor-I171L	5'-CCTGCAACGTGCTTATCAGGACCTCAGCCTC-3'
1B1-fcor-L432V	5'-CTGTGAATCATGACCC <u>A</u> CTGAAGTGGCCTAACCCG-3'
1B1-rcor-L432V	5'-CGGGTTAGGCCACTTCAGTGGGTCATGATTACAG-3'

Poté bylo připraveno několik plasmidů nesoucích gen s mutovanými geny CYP1A1 a CYP1A2 a jeden s mutovaným genem CYP1B1. Všechny mutace byly navrženy tak, aby při expresi proteinu došlo k požadované záměně aminokyseliny. K mutagenezi byly použity primery ukázané v tabulce 9.

Tab. 9 Primery použité k mutagenezi genů CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1

Báze mutující původní gen je vyznačena podtržením v sekvenci forward primeru.

Název	Sekvence
1A1-R135Q-f	5'-GTGTGGGCTGCCCCG <u>C</u> AGCGCCTGGCCCAGAATG-3'
1A1-R135Q-r	5'-CATTCTGGGCCAGGCGCTGGCGGGCAGCCCACAC-3'
1A1-Q139R-f	5'-GCCGGCGCCTGGCCCCGGAATGGCCTGAAAAG-3'
1A1-Q139R-r	5'-CTTTTCAGGCCATTCCGGGCCAGGCGCCGGC-3'
1A1-Q293R-f	5'-CTGTCAGGAGAAGCGGCTGGATGAGAACGC-3'
1A1-Q293R-r	5'-GCGTTCTCATCCAGCCGCTTCTCCTGACAG-3'
1A1-K454Q-f	5'-GATTATCTTTGGCATGGGCCAGCGGAAGTGTATCG-3'
1A1-K454Q-r	5'-CGATACACTTCCGCTGGCCCATGCCAAAGATAATC-3'
1A1-S122A-f	5'-GTAATGGTCAGAGCATGGCCTTCAGCCCAGACTC-3'
1A1-S122A-r	5'-GAGTCTGGGCTGAAGGCCATGCTCTGACCATTAC-3'
1A2-R137Q-f	5'-GTGTGGGCTGCCCCG <u>C</u> AGCGCCTGGCCCAGAATG-3'
1A2-R137Q-r	5'-CATTCTGGGCCAGGCGCTGGCGGGCAGCCCACAC-3'
1A2-Q141R-f	5'-GCCGGCGCCTGGCCCCGGAATGCCCTCAACACC-3'
1A2-Q141R-r	5'-GGTGTGAGGGCATTCGGGGCAGGCGCCGGC-3'
1A2-R296Q-f	5'-GTTCAAGCACAGCAAGAAGGGGCCTC <u>A</u> AGCCAGCGGCAACCTCATCCCA CAG-3'
1A2-R296Q-r	5'-CTGTGGGATGAGGTTGCCGCTGGCTTGAGGCCCTTCTTGCTGTGCTTGA AC-3'

1A2-K455Q-f	5'-GCTGTTTGGCATGGGCCAGCGCCGGTGTATCG-3'
1A2-K455Q-r	5'-CGATACACCGGCGCTGGCCCATGCCAAACAGC-3'
1A2-T124V-f	5'-CTGGCCAGAGCTTGGTCTTCAGCACAGACTCTG-3'
1A2-T124V-r	5'-CAGAGTCTGTGCTGAAGACCAAGCTCTGGCCAG-3'
1B1-A133S-f	5'-CGGCGGCCGCAGCATGTCTTTTCGGCCACTACTC-3'
1B1-A133S-r	5'-GAGTAGTGGCCGAAAGACATGCTGCGGCCGCCG-3'

3.3 REKOMBINANTNÍ EXPRESE A PURIFIKACE PROTEINŮ

3.3.1 Heterologní exprese lidské NADH:cytochrom b₅ reduktasy

Použité roztoky:

LB médium

10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl / 1 litr vody

TB médium

12 g trypton, 24 g kvasničný extrakt, 4 ml glycerol / 900 ml vody

Přidat 100 ml roztoku obsahujícího 2,31 g KH₂PO₄ a 12,54 g K₂HPO₄

B5R-A

100 mM KH₂PO₄, pH 6,8; 500 mM NaCl

B5R-B

100 mM KH₂PO₄, pH 6,8; 500 mM NaCl; 50 mM imidazol

B5R-C

100 mM KH₂PO₄, pH 6,8; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol

B5R-D

100 mM KH₂PO₄, pH 6,8; 150 mM NaCl; 0,1 mM imidazol

Plasmid b5r3/pET28 byl transformován do buněk *Escherichia coli* kmene C41(DE3) a selektován na LB agarové plotně obsahující kanamycin (50 µg/ml). Po noční inkubaci v 37 °C byla z plotny odebrána jedna kolonie a ta byla inkubována přes noc za stejné teploty při třepání 220 RPM v tekutém LB médiu obsahující kanamycin. Protein lze

získat i inkubací odškrábnutých zamražených buněk nesoucích plasmid bez nutnosti transformace při každé produkci.

Noční kultura byla další den 100x ředěna do LB média obsahujícího kanamycin (50 µg/ml) a riboflavin (5 µg/ml). Bakterie byly pěstovány v 37 °C při třepání 220 RPM dokud optická denzita měřená při 600 nm nedosáhla přibližné hodnoty 0,8. Poté bylo dodáno IPTG do 0,1 mM koncentrace, teplota inkubace byla snížena na 30 °C, samotná inkubace pokračovala dalších 16 hodin.

Poté byly buňky sklizeny centrifugací při 3900 x g a 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly 2x resuspendovány v pufru B5R-A. Toto promytí bylo určeno k oddělení přebytečného riboflavinu a proteas přítomných v médiu.

Do směsi byl přidán lysozym do finální koncentrace 0,1 mg/ml a směs byla po 30 minut míchána na ledu. Poté bylo dodáno PMSF do 1 mM koncentrace a provedeno 6 sonikačních pulzů trvajících 30 sekund při výkonu sondy 45 W s přestávkou na ledu cca 2 minuty.

Směs byla centrifugována při 20000 x g po dobu 20 minut a zářivě žlutě zbarvený supernatant byl nanesen na kolonu nosiče Ni-NTA Superflow resin (3 cm x 2,5 cm) ekvilibrovaného puftrem B5R-A. Kolona byla poté promyta 250 ml pufru B5R-B, protein eluován puftrem B5R-C a zahuštěn v centrifugačních koncentrátorech s membránou 30000 MWCO firmy Millipore. Finální preparát byl 2x dialyzován proti 200-násobku pufru B5R-D a uchován v -80 °C.

3.3.2 Heterologní exprese potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR)

Použité roztoky:

LB médium

10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl / 1 litr vody

TB médium

12 g trypton, 24 g kvasničný extrakt, 4 ml glycerol / 900 ml vody

Přidat 100 ml roztoku obsahujícího 2,31 g KH_2PO_4 a 12,54 g K_2HPO_4

CPR-A

100 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM sacharosa; 0,5 mM EDTANa₂

CPR-B

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT

CPR-C

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 0,3% Triton X-100

CPR-D

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 0,3% Triton X-100, 100 mM KCl

CPR-E

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 0,3% Triton X-100, 300 mM KCl

CPR-F

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 0,1% deoxycholát sodný

CPR-G

100 mM Tris-Cl, pH 8; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT; 0,1% deoxycholát sodný, 2 mM 2'-AMP

CPR-H

50 mM KH₂PO₄, pH 7,7; 10% glycerol (v/v); 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT

Expresní plasmid nesoucí potkaní formu CPR byl získán darem od prof. Gradziny Szklarz. Gen je vložen v plasmidu pETOR262 a upraven vložním OmpA vodící sekvence na N-konci proteinu. Vlivem signální proteasy I je velká část OmpA sekvence z proteinu odštěpena. Finální produkt má na N-konci ponechanou sekvenci osmi aminokyselin a je plně aktivní [129].

Původní postup byl značně upraven dle [130], jelikož poskytuje větší množství aktivnějšího proteinu o vyšší čistotě. Protein lze získat inkubací odškrábnutých zamražených buněk nesoucích plasmid bez nutnosti transformace při každé produkci.

Plasmid CPR/pETOR262 byl transformován do buněk *Escherichia coli* kmene JM109(DE3) a selektován na LB agarové plotně obsahující kanamycin (50 µg/ml). Po noční inkubaci v 37 °C byla z plotny odebrána jedna kolonie a ta byla inkubována přes noc za stejné teploty při třepání 220 RPM v tekutém LB médiu obsahující kanamycin.

Noční kultura byla další den 100x ředěna do TB média obsahujícího kanamycin (50 µg/ml) a riboflavin (1 µg/ml). Bakterie byly pěstovány v 37 °C při třepání 220 RPM dokud optická denzita měřená při 600 nm nedosáhla přibližné hodnoty 0,8. Poté bylo dodáno IPTG do 0,5 mM koncentrace, teplota byla snížena na 30 °C, třepání bylo sníženo na 190 RPM a samotná inkubace pokračovala dalších 48 hodin.

Poté byly buňky „sklizeny“ centrifugací při 5000 RPM a 4 °C po dobu 20 minut (Janetzki K-76). Pelety byly resuspendovány v pufru CPR-A a byl dodán lysozym do finální koncentrace 0,1 mg/ml. Směs byla míchána v ledu po dobu 45 minut a vzniklé sféroplasty byly odděleny centrifugací při 3900 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly resuspendovány v pufru CPR-B.

Resuspendované sféroplasty byly podrobeny 6 sonikačním pulzům trvajícím 45 sekund při výkonu sondy 45 W s přestávkou na ledu cca 2 minuty. Sonikát byl poté centrifugován při 10000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Následně byl supernatant podroben centrifugací při 180000 x g a 4 °C po dobu 60 minut. Získané membrány byly homogenizovány v pufru CPR-C a ponechány 2 hodiny solubilizovat na ledu. Poté byla směs centrifugována při 100000 x g a 4 °C po dobu 60 minut.

Solubilizát byl za pokojové teploty nanesen na kolonu DEAE sepharosy Fast Flow (20 cm x 5 cm) ekvilibrované puftrem CPR-C. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 500 ml pufru CPR-D a následně byl protein eluován puftrem CPR-E. Eluát byl za pokojové teploty nanesen na malou kolonu 2'5'-ADP sepharosy 4B (4 cm x 1 cm) ekvilibrované puftrem CPR-C a po zachycení promyt 250 ml pufru CPR-F. Poté byl protein eluován puftrem CPR-G. Získaný eluát byl koncentrován v centrifugačních koncentrátorech s membránou 30000 MWCO firmy Millipore a dialyzován třikrát proti 200-násobku pufru CPR-H, přičemž v první dialýze byl do tohoto pufru přidán kofaktor FMN o 2 µM koncentraci. Preparát byl uchován v -80 °C.

3.3.3 Heterologní exprese membránových forem cytochromu b₅

Použité roztoky:

LB médium

10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl / 1 litr vody

TB médium

12 g trypton, 24 g kvasničný extrakt, 4 ml glycerol / 900 ml vody

Přidat 100 ml roztoku obsahujícího 2,31 g KH₂PO₄ a 12,54 g K₂HPO₄

Cytb5-A

75 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM sacharosa; 0,5 mM EDTANa₂

Cytb5-B

75 mM Tris-Cl, pH 8; 0,1 mM EDTANa₂

Cytb5-C

20 mM Tris-Cl, pH 8; 0,1 mM EDTANa₂

Cytb5-D

20 mM Tris-Cl, pH 8; 20% glycerol (v/v); 2 mM β-merkapt ethanol

Cytb5-E

20 mM Tris-Cl, pH 8; 0,1% CHAPS; 2 mM β-merkapt ethanol

Cytb5-F

20 mM Tris-Cl, pH 8; 0,1% CHAPS; 2 mM β-merkapt ethanol; 400 mM KCl; 10 mM imidazol

Cytb5-G

20 mM Tris-Cl, pH 8; 0,1% CHAPS; 2 mM β-merkapt ethanol; 100 mM imidazol

Cytb5-H

50 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 0,5 mM EDTANa₂; 0,1 mM DTT

Plasmid cyt *b₅*/pET22b nebo plasmid nesoucí mutovaný gen byl transformován do buněk *Escherichia coli* kmene C41(DE3) a selektován na LB agarové plotně obsahující ampicilin (100 µg/ml). Po noční inkubaci v 37 °C byla z plotny odebrána jedna kolonie a ta byla inkubována přes noc za stejné teploty při třepání 220 RPM v tekutém LB médiu obsahujícím ampicilin.

Noční kultura byla další den 100x ředěna do TB média obsahujícího ampicilin (100 µg/ml). Bakterie byly pěstovány v 37 °C při třepání 220 RPM, dokud optická denzita měřená při 600 nm nedosáhla přibližné hodnoty 0,8. Poté bylo dodáno IPTG do 0,1 mM koncentrace, teplota inkubace byla snížena na 25 °C, třepání bylo sníženo na 190 RPM a samotná inkubace pokračovala dalších 24 hodin.

Poté byly buňky sklizeny centrifugací při 3900 x g a 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly resuspendovány v pufru Cytb5-A a byl dodán lysozym do finální koncentrace 0,1 mg/ml. Směs byla míchána v ledu po dobu 45 minut a vzniklé sféroplasty byly odděleny centrifugací při 3900 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly resuspendovány v pufru Cytb5-B v poměru přibližně 40 ml/kultura z 1 litru média.

Resuspendované sféroplasty byly podrobeny 6 sonikačním pulzům trvajícím 45 sekund při výkonu sondy 45 W s přestávkou na ledu cca 2 minuty. Po sonikaci bylo odebráno 20 µl vzorku a 50x naředěno puftrem Cytb5-C. Do tohoto vzorku byl přidáván 2 mM hemin a spektrofotometricky byl měřen nárůst píku při 413 nm. Poté, co se ve spektru začal projevovat nárůst píku také při 390 nm bylo přidávání heminu ukončeno, a z tohoto měření bylo vypočteno množství heminu nutné pro rekonstituci apoformy cytochromu *b₅* s heminem, což bylo následně provedeno v celém objemu sonikátu.

Sonikát byl poté centrifugován při 10000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Následně byl supernatant podroben centrifugaci při 180000 x g a 4 °C po dobu 60 minut. Získané membrány byly homogenizovány v malém objemu pufru Cytb5-D a v tomto preparátu bylo stanoveno celkové množství proteinu. Preparát byl poté naředěn puftrem Cytb5-D na koncentraci 2 mg/ml, umístěn do chladové místnosti na automatickou míchačku a po vytemperování do něj byl po malých dávkách dodán sypký detergent CHAPS do finální 1% koncentrace (w/v). Po hodinové solubilizaci byla směs centrifugována při 100000 x g a 4 °C po dobu 60 minut a červeně zbarvený solubilizát byl 1x zředěn puftrem Cytb5-E.

Vzorek byl následně nanesen na kolonu nosiče Ni-Nta Superflow (3 cm x 2,5 cm), ekvilibrovanou puftrem Cytb5-E. Po zachycení proteinu byla kolona promyta puftrem

Cytb5-F a protein byl poté eluován pufrém Cytb5-G. Získaný eluát byl koncentrován v centrifugačních koncentrátorech s membránou 10000 MWCO firmy Millipore a dialyzován dvakrát proti 200-násobku pufru Cytb5-H. Preparát byl uchován v -80 °C.

3.3.4 Heterologní exprese forem cytochromů P450 rodiny 1

Použité pufrý:

LB médium

10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl / 1 litr vody

Roztok stopových prvků (4000x koncentrovaný)

24,5 g citrát železitý; 1,31 g chlorid zinečnatý; 2 g chlorid kobaltnatý hexahydrát; 2 g molybdenan sodný dihydrát; 1 g chlorid vápenatý dihydrát; 1,27 g chlorid měďnatý dihydrát; 0,5 g kyselina boritá; 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové; voda do objemu 1 litr

Modifikované TB médium

12 g trypton, 24 g kvasničný extrakt, 4 ml glycerol, 2 g baktopepton / 900 ml vody

Přidáno 100 ml roztoku obsahujícího 2,31 g KH_2PO_4 a 12,54 g K_2HPO_4

Dodán 1 mM thiamin a roztok stopových prvků

CYP-A

100 mM Tris-acetát, pH 7,6; 500 mM sacharosa; 0,5 mM EDTANa_2

CYP-B

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 10 mM β -merkapt ethanol; 6 mM octan hořečnatý; 0,1 mM EDTANa_2

CYP-C

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 10 mM β -merkapt ethanol

CYP-D

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 1% CHAPS; 500 mM NaCl; 10 mM β -merkapt ethanol, 30 μM α -naftoflavon

CYP-E

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 0,5% CHAPS; 500 mM NaCl, 10 mM β -merkapt ethanol

CYP-F

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 0,5% CHAPS; 500 mM NaCl; 25 mM imidazol. 10 mM β -merkapt ethanol

CYP-G

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 0,5% CHAPS; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol, 10 mM β -merkapt ethanol

CYP-H

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 20% glycerol; 0,1 mM EDTANa_2

Expresní plasmid pCW nesoucí příslušný gen cytochromu P450 byl transformován do buněk *Escherichia coli* kmene JM109 a selektován na LB agarové plotně obsahující ampicilin (100 $\mu\text{g/ml}$). Po noční inkubaci v 37 °C byla z plotny odebrána jedna kolonie a ta byla inkubována přes noc za stejné teploty při třepání 220 RPM v tekutém LB médiu obsahující ampicilin.

Noční kultura byla další den 100x ředěna do modifikovaného TB média obsahujícího ampicilin. Bakterie byly pěstovány v 37 °C při třepání 220 RPM, dokud optická denzita měřená při 600 nm nedosáhla přibližné hodnoty 0,8. Poté bylo dodáno IPTG do 1 mM koncentrace. V případě produkce CYP1A1 a CYP1B1 byla do kultury dodána také ALA do 0,5 mM koncentrace. Následně byla teplota snížena na 30 °C, třepání bylo sníženo na 180 RPM a samotná inkubace pokračovala dalších 48 hodin.

Poté byly buňky sklizeny centrifugací při 5000 RPM a 4 °C po dobu 20 minut (Janetzki K-76). Pelety byly resuspendovány v pufru CYP-A a byl dodán lysozym do finální koncentrace 0,2 mg/ml. Směs byla míchána v ledové lázni po dobu 15 minut, následně byl přidán stejný objem vychlazené vody a směs byla opět míchána po dalších 15 minut. Vzniklé sféroplasty byly odděleny centrifugací při 3900 x g, 4 °C po dobu 20 minut. Pelety byly resuspendovány v pufru CYP-B.

Resuspendované sféropasty byly podrobeny 7 sonikačním pulzům trvajícím 30 sekund při výkonu sondy 45 W s přestávkou na ledu cca 2 minuty. Sonikát byl poté centrifugován při 10000 x g a 4 °C po dobu 10 minut. Následně byl supernatant podroben centrifugací při 180000 x g a 4 °C po dobu 60 minut. Získané membrány byly homogenizovány v minimálním objemu pufru CYP-C. U preparátu byl stanoven celkový obsah proteinů, s použitím pufru CYP-D byla směs naředěna na proteinovou koncentraci 2 mg/ml a ponechána 3 hodiny solubilizovat na ledu. Poté byla směs centrifugována při 100000 x g a 4 °C po dobu 60 minut.

Solubilizát byl v chladové místnosti nanesen na kolonu Ni-Nta Superflow (3 cm x 2,5 cm) ekvilibrované puftrem CPR-E. Po nanesení vzorku byla kolona promyta puftrem CPR-F a následně byl protein eluován puftrem CPR-G. Získaný eluát byl koncentrován v centrifugačních koncentrátorech s membránou 30000 MWCO firmy Millipore a dialyzován třikrát proti 200-násobku pufru CPR-H, přičemž první dvě dialýzy trvaly 4 hodiny, poslední 24 hodin. Preparát byl uchován v -80 °C.

3.3.5 Heterologní exprese dalších forem cytochromu P450

Použité pufrы:

LB médium

10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl / 1 litr vody

Roztok stopových prvků (4000x koncentrovaný)

24,5 g citrát železitý; 1,31 g chlorid zinečnatý; 2 g chlorid kobaltnatý hexahydrát; 2 g molybdenan sodný dihydrát; 1 g chlorid vápenatý dihydrát; 1,27 g chlorid měďnatý dihydrát; 0,5 g kyselina boritá; 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové; voda do objemu 1 litr

Modifikované TB médium

12 g trypton, 24 g kvasničný extrakt, 4 ml glycerol, 2 g baktepepton / 900 ml vody

Přidáno 100 ml roztoku obsahujícího 2,31 g KH_2PO_4 a 12,54 g K_2HPO_4

Dodán 1 mM thiamin a roztok stopových prvků

Expresní plasmid pCW nesoucí příslušný gen cytochromu P450 byl transformován do buněk *Escherichia coli* kmene JM109 a selektován na LB agarové plotně obsahující

ampicilin (100 µg/ml). Po noční inkubaci v 37 °C byla z plotny odebrána jedna kolonie a ta byla inkubována přes noc za stejné teploty při třepání 220 RPM v tekutém LB médiu obsahující ampicilin.

Noční kultura byla další den 100x ředěna do modifikovaného TB média obsahujícího ampicilin. Bakterie byly pěstovány v 37 °C při třepání 220 RPM, dokud optická denzita měřená při 600 nm nedosáhla přibližné hodnoty 0,8. Poté bylo dodáno IPTG do 1 mM koncentrace. V případě produkce CYP1A1 a CYP1B1 byla do kultury dodána také ALA do 0,5 mM koncentrace. Následně byla teplota snížena na 30 °C, třepání bylo sníženo na 180 RPM a samotná inkubace pokračovala dalších 48 hodin.

3.4 ANALYTICKÉ METODY

3.4.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla zjišťována metodou využívající 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinu (BCA). Jedná se o modifikaci starší Lowryho metody. Využívá se tvorby barevného komplexu měďných iontů s BCA v alkalickém prostředí a hovězím sérovým albuminem jako standardem. Intenzita zabarvení měřená spektrofotometricky při 562 nm je přímo úměrná koncentraci proteinu.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno po 9 µl proteinových standardů BSA a vhodně ředěných vzorků a také destilované vody představující „slepé“ vzorky. Vzorky pro stanovení byly ředěny v destilované vodě.

Následně bylo k naneseným roztokům pipetováno 260 µl čerstvě připraveného činidla. Zmíněné činidlo bylo připraveno rozpuštěním bicinchoninové kyseliny v padesáti dílech roztoku A (0,4% NaOH (w/v); 0,95% NaHCO₃ (w/v); 2% Na₂CO₃ x 10 H₂O (w/v); 0,16 vínan sodný (w/v); pH 11,25) a jednom díle roztoku B (4% CuSO₄ x 5 H₂O (w/v)). Roztok B byl přidán po úplném rozpuštění roztoku B, přičemž výsledná koncentrace BCA byla 1%.

Po přidání činidla byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C. Poté byly měřeny absorbance vzorků při 562 nm na čtečce mikrotitračních destiček a data byla následně vyhodnocena v programu Kim32.

3.4.2 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Ke stanovení cytochromu P450 bylo využito charakteristické absorpce komplexu proteinu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm. K výpočtu byla použita hodnota molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [131].

V případě měření purifikované proteinu byl preparát ředěn 100 mM KH_2PO_4 o pH 7,4 s obsahem 20% glycerolu (v/v) a do roztoku bylo dodáno malé množství dithioničitanu sodného. Následně byl roztok rozdělen do 2 kyvet. Po „vynulování“ spektrofotometru byl roztok v jedné z kyvet probublán oxidem uhelnatým. Kyveta bez probublání byla použita jako reference pro další měření [132]. U proteinů z rodiny CYP1 byl vzorek měřen po přibližně 5 minutách, jelikož tyto proteiny jsou redukovány velmi pomalu a pík označující maximum se může po určitou dobu stále zvyšovat. Měření bylo ukončeno tehdy, kdy pík již nenarůstal [133, 134].

V případě měření přímo v bakteriálních kulturách byly 2 ml kultury centrifugovány při 10000 x g a následně byly buňky resuspendovány ve 2 ml 100 mM KH_2PO_4 o pH 7,4 s obsahem 20% glycerolu (v/v). V tomto okamžiku mohl být do směsi dodán dithioničitan sodný (10 μl 500 mM roztoku ve vodě), do některých měření ale v rámci experimentů dodán nebyl. Směs byla následně rozdělena do 2 kyvet. Po vynulování spektrofotometru byl roztok v jedné z kyvet probublán oxidem uhelnatým. Kyveta bez probublání byla použita jako reference pro další měření. I u těchto vzorků bylo měření po přibližně 5 minutách opakováno, aby byl zachycen případný nárůst píku maxima. U těchto vzorků byl přítomen i pík odpovídající denaturované formě P420 a proto byla k určení její koncentrace použita hodnota molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{420} = 111 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [132].

3.4.3 Stanovení koncentrace NADPH:cytochrom P450 reductasy

Tento protein díky vázanému kofaktoru FAD vykazuje specifickou absorpci při 454 nm, což bylo využito pro stanovení jeho koncentrace. K výpočtu byla použita hodnota molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{454} = 21,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [135, 136].

3.4.4 Stanovení koncentrace NADH:cytochrom b₅ reduktasy 3

Tento protein díky vázanému kofaktoru FAD vykazuje specifickou absorpci kofaktoru při 460 nm, což bylo využito pro stanovení jeho koncentrace. K výpočtu byla použita hodnota molárního extinkčního koeficientu kofaktoru $\varepsilon_{454} = 10,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [137].

3.4.5 Stanovení aktivity NADH:cytochrom b₅ reduktasy 3 vůči cytochromu b₅

Aktivita proteinu CYB5R3 byla stanovena proti formám membránového cytochromu b₅. Reakce byla provedena ve 100 mM KH₂PO₄ o pH 7,4 temperovaného na 25 °C. Do kyvety bylo pipetováno v následujícím pořadí 965 μl pufru, 20 μl vhodně ředěné formy cytochromu b₅ do finální 2 μM koncentrace a 5 μl vhodně ředěného preparátu proteinu CYB5R3. Po promíchání byla reakce zahájena přidáním 10 μl 10 mM NADH. Reakce byla sledována vzestupem absorbance při 424 nm. Pro výpočet aktivity musela být reakce lineární alespoň po jednu minutu, a proto bylo ředění preparátu CYB5R3 upravováno pro každou formu cytochromu b₅. Aktivita byla spočtena na jako rozdíl absorbance mezi redukovanou a oxidovanou formou cytochromu b₅ při 424 nm s využitím koeficientu 124 mmol $\cdot \text{cm}^{-1}$ [138].

3.4.6 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Použité roztoky vyžadující popis složení:

Polymerační roztok: 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v)

Elektrodový pufr: 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3

Vzorkový redukující pufr (4x koncentrovaný): 0,25 M Tris-HCl; 8% SDS (w/v); 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkptoethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v); pH 6,8

Barvící lázeň: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)

Odbarvovací lázeň: 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného se používá k separaci proteinu na základě jejich molekulové hmotnosti.

Směs tvořící po polymeraci spodní gel byla postupně pipetována do směšovací nádoby, promíchána a pipetována mezi dvě skla oddělená skleněnými „spacery“ (šířka 1 mm) přítomnými na jednom ze skel. Skla byla následně vertikálně umístěna v elektroforetické aparatuře. Gel byl převrstven destilovanou vodou a ponechán po 30 minut tuhnout. Poté byla voda odlita.

Horní 5% zaostřovací gel byl připraven dle níže zobrazené tabulky 10. Směs byla opět krátce promíchána a pipetována na spodní separační gel. Po napipetování byl do tuhajícího zaostřovacího gelu umístěn plastový hřeben k vytvoření jamek na vzorky. Byl použit 10-jamkový hřeben. Horní gel byl ponechán tuhnout asi 30 minut. Poté byl hřeben vyjmut, byl otevřen spodní těsnící díl elektroforetické aparatury a aparatura byla umístěna do vaničky. Horní i spodní elektroodový prostor aparatury byl naplněn elektroodovým pufrem.

Vzorky byly smíchány s odpovídajícím množstvím 4x vzorkového redukcujícího pufru a vody. Výsledné roztoky byly 5 minut povařeny, krátce centrifugovány a pomocí Hamiltonovy stříkačky nanášeny do jamek. Bylo nanášeno 15 μ l vzorku na jamku. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy byla skla vyjmuta z elektroforetické aparatury a skla byla opatrně odlepena. Horní zaostřovací gel byl odstraněn a spodní separační gel byl vložen na 1 hodinu do barvicí lázně. Následně byl odbarvován v odbarvovací lázni, kde byl po dvou výměnách lázně asi po 2-3 hodinách dostatečně odbarven.

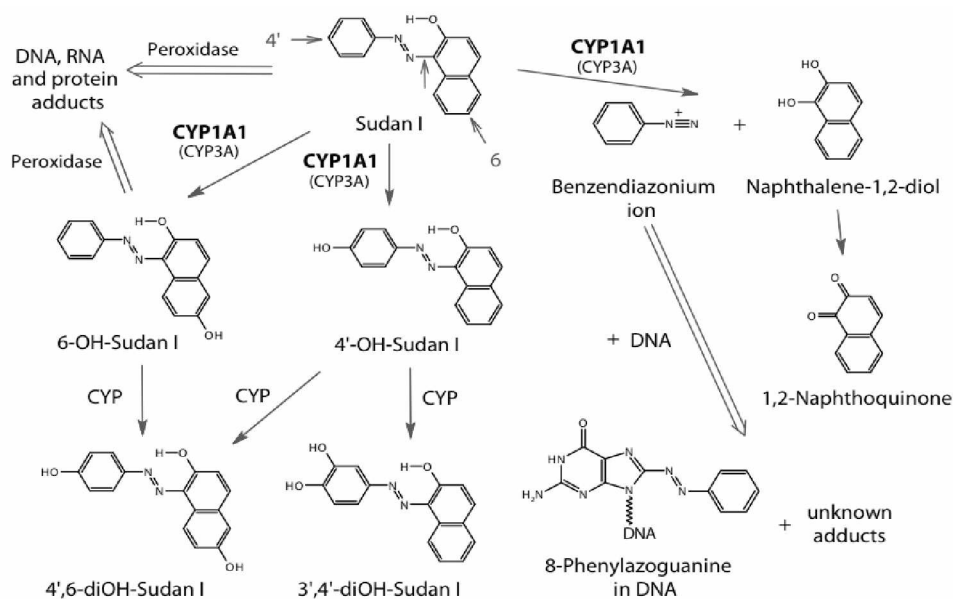
Tab. 10 Příprava gelů na SDS-PAGE

Složení	5% horní gel	8% spodní gel	10% spodní gel	12% spodní gel	15% spodní gel
voda [ml]	1,4	2,3	1,9	1,6	1,1
polymerační roztok [ml]	0,33	1,3	1,7	2	2,5
1,5 M Tris-Cl (pH 8,8) [ml]	0	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS [μl]	20	50	50	50	50
10% APS [μl]	20	50	50	50	50
TEMED [μl]	2	3	2	2	2
1,5 M Tris-Cl (pH 6,8) [μl]	0,25	0	0	0	0

3.5 STUDIUM METABOLISMU SUBSTRÁTŮ CYTOCHROMŮ P450

3.5.1 Metabolismus Sudanu I a rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Sudan I je barvivo v průmyslu používané k barvení plastů, obuvi, vosků a dalších produktů. Je považován za slabý lidský karcinogen a mutagen [139] Rodinou CYP1A je metabolizován na 4'-hydroxyderivát, 6-hydroxyderivát a 4',6-dihydroxyderivát [29, 140, 141]. Dále jejich působením vzniká benzendiazoniový iont. Metabolismus Sudanu I ukazuje obrázek 16.



Obr. 16 Metabolismus Sudanu I

Převzato z [139].

Oxidace Sudanu I v potkaních jaterních mikrosomech je detailně popsána v publikaci, která je přílohou disertační práce č. 1 [141].

V této kapitole jsou pak detailně popsány metody, kde byl Sudan I metabolizován cytochromy P450 v rekonstituovaných systémech. Detaily metod jsou rovněž popsány v publikaci č. 3, která je přílohou disertační práce.

Cytochromy P450 a další proteinové složky ovlivňující jeho funkci byly rekonstituovány v arteficiální membráně tvořené liposomy (dilaurylfosfatidylcholin, DLPC).

Rekonstituovaný systém byl připraven o následujícím složení:

- rekombinantní lidský cytochrom P450 o koncentraci 2 μM

- rekombinantní NADPH:cytochrom P450 reduktasa o koncentraci 2 μ M
- 0,05 mg/ml CHAPS
- 2 mg/ml DLPC
- 3 mM glutathion
- 50 mM HEPES

Nejdříve byl ve skleněné zkumavce odpařen roztok DLPC (5 mg/ml v chloroformu) tak, aby se vytvořila vrstvička lipidu. Poté byl do zkumavky přidán roztok detergentu CHAPS (0,5 mg/ml ve vodě), glutathionu (30 mM ve vodě) a HEPES pufru (500 mM). Směs byla sonikována 2 x 3 minuty a poté byl přidán příslušný CYP a CPR. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě za pomalého míchání. Při provádění inkubace s NADH: cytochrom b_5 reduktasou nebyla do rekonstituce přidána NADPH: cytochrom P450 reduktasa a byla nahrazena právě výše zmíněným proteinem.

Inkubační směsi byly připraveny ve skleněných zkumavkách v dubletech či tripletech o celkovém objemu 1 ml. Nejprve byl přidán rekonstituovaný systém (0,01 μ M finální koncentrace CYP1A1 a 0,1 μ M finální koncentrace CYP1A2 v případě použití CPR; 0,1 μ M finální koncentrace CYP1A1 a 0,5 μ M finální koncentrace CYP1A2 v případě použití CYB5R3) a příslušný cytochrom b_5 . Poté byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě za pomalého míchání. Následně byl dodán fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) a Sudan I do 50 μ M koncentrace. Zásobní roztok Sudanu I byl připraven v methanolu v 5 mM koncentraci a do inkubace byl dodán takový objem, aby methanol tvořil 1% finálního roztoku.

Směs byla poté preinkubována 5 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM). Reakce byla iniciována přidáním NADPH (10 mM ve fosfátovém pufru) do finální koncentrace 1 mM. Směs byla důkladně zamíchána a inkubována ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM). V případě CYP1A1 byla inkubace prováděna po 10 minut, v případě CYP1A2 po dobu 15 minut.

Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Vzorky byly extrahovány 2 x 1 ml ethylacetátu intenzivním protřepáním (2 min na vortexu). Směs byla poté centrifugována po dobu 5 minut při. Horní organická fáze byla odebrána skleněným kapátkem a odpařena do sucha na vakuové odparce při pokojové teplotě. Vzorky byly rozpuštěny ve 100 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC.

V případě studie reakce pomocí NADH: cytochrom b_5 reduktasy byl cytochrom b_5 dodán v desetinásobném poměru vůči koncentraci cytochromu P450. Další změnou bylo nahrazení NADPH za NADH.

Metabolity Sudanu I vzniklé v inkubačních směsích byly separovány pomocí HPLC na přístroji Agilent 1200 Series. Podmínky metody jsou popsány v tabulce 11.

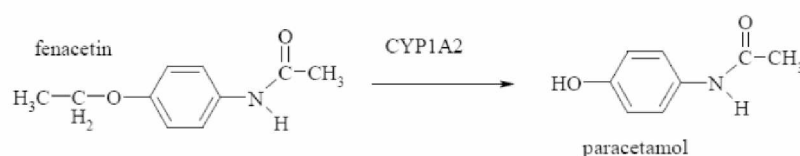
Tab. 11 Parametry chromatografie při rozdělení metabolitů Sudanu I

Přístroj	Agilent 1200 Series s DAD detektorem
Kolona	Chromolith Performance RP-18e 100 mM (zrnitost 4,6 mm) s předkolonou
Mobilní fáze	75% methanol
Teplota kolony	30 °C
Doba metody	10 min
Nástřik	40 ul
Detekce	480 nm
Průtok	1,5 ml/min

Plochy píků vzniklých metabolitů Sudanu I, typicky dvou monohydroxyderivátů a jednoho dihydroxyderivátu, byly sečteny. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. Signifikance vzorků byla určována proti vzorku bez obsahu cytochrom b_5 .

3.5.2 Metabolismus fenacetinu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Fenacetin je léčivá látka užívaná proti bolesti a teplotě. Může vyvolat selhání ledvin a její užívání je spojeno s určitými typy rakoviny. Od roku 1983 je zakázán v USA a v mnoha zemích byl v klinické praxi nahrazen vlastním metabolitem, paracetamolem [142]. CYP1A2 přeměňuje fenacetin na paracetamol O-deethylací, jak je ukázáno na obrázku 17.



Obr. 17 Metabolická přeměna fenacetinu
Převzato z[143].

Cytochromy P450 a další proteinové složky ovlivňující jeho funkci byly rekonstituovány v arteficiální membráně tvořené liposomy (dilaurylfosfatidylcholin, DLPC).

Rekonstituovaný systém byl připraven stejně jako v kapitole 3.5.1.

Inkubační směsi byly připraveny v plastových zkumavkách v dubletech o celkovém objemu 0,5 ml. Nejprve byl přidán rekonstituovaný systém (0,05 μ M finální koncentrace CYP1A1 nebo CYP1A2) a příslušný cytochrom b₅. Poté byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě za pomalého míchání. Následně byl dodán fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4) a fenacetin do 200 μ M koncentrace. Zásobní roztok fenacetinu byl připraven v methanolu ve 20 mM koncentraci a do inkubace byl dodán takový objem, aby methanol tvořil 1% finálního roztoku.

Směs byla poté preinkubována 5 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM). Reakce byla iniciována přidáním NADPH (10 mM ve fosfátovém pufru) do finální koncentrace 1 mM. Směs byla důkladně zamíchána a inkubována 30 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM).

Reakce byla zastavena přidáním 5 μ l 60% kyseliny chloristé následným intenzivním protřepáním. Vzorky byly inkubovány 10 minut v ledové lázni a následně centrifugovány 5 minut při 4 °C a 16000 x g. Odebraná kapalná fáze byla použita přímo k rozdělení látek na HPLC.

Podmínky metody jsou popsány v tabulce 12.

Tab. 12 Parametry chromatografie při rozdělení paracetamolu a fenacetinu

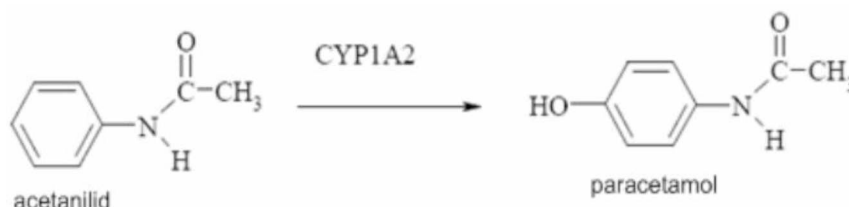
Přístroj	Agilent 1200 Series s DAD detektorem
Kolona	Chromolith Performance RP-18e 100 mM (zrnitost 4,6 mm) s předkolonou
Mobilní fáze A	20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 5,4
Mobilní fáze B	Methanol
Rozpis průtoku	0 min až 4 min – isokraticky 88% A, 12% B 4 min až 9 min – gradient do 60% A, 40% B 9 min až 13,5 min – isokraticky 60% A, 40% B 13,5 min až 14,5 min – gradient do 88% A, 12% B 14,5 min až 20 min – isokraticky 88% A, 12% B
Teplota kolony	30 °C
Doba metody	20 min

Nástřik	20 ul
Detekce	254 nm
Průtok	1 ml/min

Plocha píka vzniklého paracetamolu byla převedena na jednotky odpovídající časové aktivitě enzymu pomocí kalibrační křivky. Ta byla sestavena z měření provedeného s roztoky čistého paracetamolu s různou koncentrací. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. Signifikance vzorků byla určována proti vzorku bez obsahu cytochrom b₅.

3.5.3 Metabolismus acetanilidu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Acetanilid byl původně lékem proti bolesti a horečce. Jeho vysoké toxické účinky ale vedly k jeho zákazu. V klinické praxi byl nahrazen fenacetinem a později paracetamolem, který je metabolitem obou zmíněných látek [142]. CYP1A2 přeměňuje acetanilid hydroxylací, což je možné vidět na obrázku 18.



Obr. 18 Metabolismus acetanilidu

Převzato z [143].

Cytochromy P450 a další proteinové složky ovlivňující jeho funkci byly rekonstituovány v arteficiální membráně tvořené liposomy (dilaurylfosfatidylcholin, DLPC).

Rekonstituovaný systém byl připraven stejně jako v kapitole 3.5.1.

Inkubační směsi byly připraveny v skleněných zkumavkách v dubletech o celkovém objemu 0,5 ml. Nejprve byl přidán rekonstituovaný systém (0,1 μM finální koncentrace CYP1A2) a příslušný cytochrom b₅. Poté byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě za pomalého míchání. Následně byl dodán fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) a acetanilid do 500 μM koncentrace. Zásobní roztok acetanilidu byl

připraven v methanolu v 50 mM koncentraci a do inkubace byl dodán takový objem, aby methanol tvořil 1% finálního roztoku.

Směs byla poté preinkubována 5 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM). Reakce byla iniciována přidáním NADPH (10 mM ve fosfátovém pufru) do finální koncentrace 1 mM. Směs byla důkladně zamíchána a inkubována 30 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM).

Reakce byla zastavena přidáním 5 μ l 60% kyseliny chloristé následným intenzivním protřepáním. Vzorky byly inkubovány 10 minut v ledové lázni a následně centrifugovány 5 minut při 4 °C a 16000 x g. Odebraná kapalná fáze byla použita přímo k rozdělení látek na HPLC.

Vlastnosti metody jsou popsány v tabulce 13.

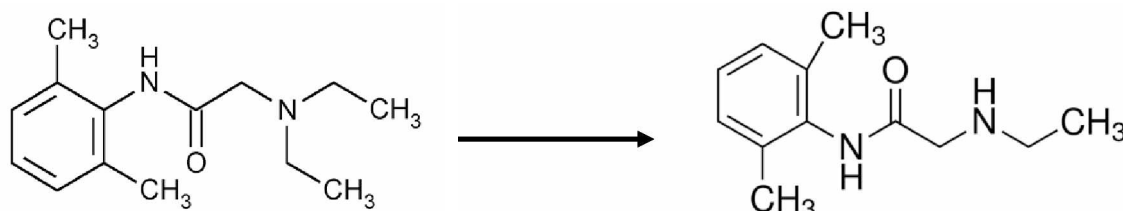
Tab. 13 Parametry chromatografie při rozdělení paracetamolu a acetanilidu

Přístroj	Agilent 1200 Series s DAD detektorem
Kolona	Chromolith Performance RP-18e 100 mM (zrnitost 4,6 mm) s předkolonou
Mobilní fáze A	20 mM KH_2PO_4 , pH 5,4
Mobilní fáze B	Methanol
Rozpis průtoku	0 min až 4 min – isokraticky 88% A, 12% B 4 min až 9 min – gradient do 60% A, 40% B 9 min až 13,5 min – isokraticky 60% A, 40% B 13,5 min až 14,5 min – gradient do 88% A, 12% B 14,5 min až 20 min – isokraticky 88% A, 12% B
Teplota kolony	30 °C
Doba metody	20 min
Nástřik	20 μ l
Detekce	254 nm
Průtok	1 ml/min

Plocha píka vzniklého paracetamolu byla převedena na jednotky odpovídající časové aktivitě enzymu pomocí kalibrační křivky. Ta byla sestavena z měření provedeného s roztoky čistého paracetamolu s různou koncentrací. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Signifikance vzorků byla určována proti vzorku bez obsahu cytochrom b_5 .

3.5.4 Metabolismus lidokainu rekombinantními lidskými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Lidokain je lékem používaným na arytmie díky jeho vlastnosti blokovat iontové kanály přenášející sodík. Vlivem CYP3A4 a CYP1A2 je metabolizován na monoethylglycinyxid, což ukazuje obrázek 19.



Obr. 19 Přeměna lidokainu na monoethylglycinyxid

Cytochromy P450 a další proteinové složky ovlivňující jeho funkci byly rekonstituovány v arteficiální membráně tvořené liposomy (dilaurylfosfatidylcholin, DLPC).

Rekonstituovaný systém byl připraven stejně jako v kapitole 3.5.1

Inkubační směsi byly připraveny v plastových zkumavkách v dubletech o celkovém objemu 0,5 ml. Nejprve byl přidán rekonstituovaný systém (0,1 μ M finální koncentrace CYP1A2) a příslušný cytochrom b₅. Poté byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě za pomalého míchání. Následně byl dodán fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4) a lidokain do 200 μ M koncentrace. Zásobní roztok lidokainu byl připraven ve vodě v 10 mM koncentraci.

Směs byla poté preinkubována 5 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM). Reakce byla iniciována přidáním NADPH (10 mM ve fosfátovém pufru) do finální koncentrace 1 mM. Směs byla důkladně zamíchána a inkubována 20 minut ve 37 °C za stálého třepání (180 RPM).

Reakce byla zastavena přidáním 0,75 ml ethylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Vzorky byly extrahovány 2 x 0,75 ml ethylacetátu intenzivním protřepáním (2 min na vortexu). Směs byla poté centrifugována po dobu 5 minut při. Horní organická fáze byla odebrána skleněným kapátkem a odpařena do sucha na vakuové odparce při pokojové teplotě. Vzorky byly rozpuštěny ve 100 μ l mobilní fáze a analyzovány pomocí HPLC.

Metabolit lidokainu vzniklý v inkubačních směsích byly separovány pomocí HPLC na přístroji Agilent 1200 Series. Vlastnosti metody jsou popsány v tabulce 14.

Tab. 14 Parametry chromatografie při rozdělení metabolitů lidokainu

Přístroj	Agilent 1200 Series s DAD detektorem
Kolona	Chromolith Performance RP-18e 100 mM (zrnitost 4,6 mm) s předkolonou
Mobilní fáze A	50 mM KH_2PO_4 , pH 4
Mobilní fáze B	Acetonitril
Rozpis průtoku	0 min až 15 min – isokraticky 86% A, 14% B
Teplota kolony	30 °C
Doba meody	15 min
Nástřik	25 μl
Detekce	214 nm
Průtok	1 ml/min

Jako výsledek byly využity plochy píku vzniklého produktu. Ve spolupráci s Mgr. Jiřím Míškem, Ph.D z katedry organické chemie PřF UK a s využitím HPLC přístroje Agilent 1220 Infinity vybaveného hmotnostním spektrometrem byl neznámý metabolit identifikován jako hledaný monoethylglycinylidid. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. Signifikance vzorků byla určována proti vzorku bez obsahu cytochrom b_5 .

3.5.5 Stanovení aktivity cytochromů P450 pomocí derivátů resorufinu

Aktivita cytochromu P450 rodiny CYP1 byla stanovena jako schopnost O-deethylovat 7-ethoxyresorufin. Vzniklý resorufin je možné měřit fluorescenčně. K reakci byl využit rekonstituovaný systém připravená ve složení: Rekonstituovaný systém byl připraven dle popisu v kapitole 3.5.1.

Reakční směs o objemu obsahovala:

- 100 mM KH_2PO_4 o pH 7,4
- 50 nM cytochrom P450 a 50 nM CPR v rekonstituovaném systému
- 7-ethoxyresorufin nebo 7-methoxyresorufin o 2,2 μM koncentraci
- 0,5 mM NADPH

Nejprve byl rekonstituovaný systém ředěn fosfátovým pufrům do požadované koncentrace. Poté byl přidán 7-ethoxyresorufin. Takto vzniklá směs byla inkubována po dobu 2 minut při laboratorní teplotě a následně bylo 150 μ l směsi pipetováno do mikrotitrační destičky a poté byl přidán roztok NADPH iniciující reakci. Fluorescence byla měřena v minutových cyklech na luminiscenčním spektrofotometru při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Metody oxidace 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu jsou rovněž detailně popsány v pracích, které tvoří přílohy č. 1 [141] a č. 3 [144] disertační práce.

Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním resorufinu na výsledné koncentrace 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,0125 μ M.

Stanovení pomocí 7-methoxyresorufinu bylo provedeno pouze pro CYP1A2. Aktivita byla stanovena ve třech nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

3.5.6 Analýza aduktů aristolochové kyseliny I s DNA metodou 32 P-postlabeling

Metoda byla provedena Prof. RNDr. Marií Stiborovou DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu dle postupu uvedeným v publikacích, které jsou přílohami disertační práce č. 1 [141] a č. 3 [144]. Rekonstituovaný systém byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.5.1. Aktivita byla stanovena ve třech nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

3.5.7 Stanovení oxidace aristolochové kyseliny I cytochromy P450

Metoda byla provedena RNDr. Františkem Bártou na pracovišti Katedře biochemie dle postupu uvedeným v [145, 146]. Detailně je metoda popsána v publikaci, jež je přílohou č. 3 disertační práce [144]. Rekonstituovaný systém byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.5.1.

Aktivita byla stanovena ve třech nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení byl použit párový Studentův t-test s hladinami významnosti $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$.

4. Výsledky a diskuse

4.1 PŘÍPRAVA PLASMIDŮ A HETEROLOGNÍ EXPRESE PROTEINŮ

4.1.1 Příprava plasmidů a heterologní exprese forem CYP1A1

Původní plasmid pCW nesoucí gen *CYP1A1* byl získán od profesora P. F. Guengeriche ze spolupracující laboratoře z Vanderbilt University z USA. Tento gen byl již upraven pro umožnění exprese proteinu v bakterii *Escherichia coli*. Úprava zahrnuje záměnu druhé aminokyselině leucinu za alanin a také úpravu počáteční sekvence DNA pro snížení pravděpodobnosti tvorby vlásenek na transkribované mRNA [133]. Porovnání počátku přirozené sekvence genu a proteinu s upraveným počátkem ukazuje tabulka 15. Z ní vyplývá, že i přes úpravy počátku sekvence se ve složení proteinu projevuje jediná změna v pozici druhé aminokyseliny.

Tab. 15 Srovnání počátků genů a proteinů přirozeného a modifikovaného CYP1A1. Změny jsou vyznačeny podtržením. Vytvořeno s využitím informací z [133]

Srovnání genů <i>CYP1A1</i>	
WT	ATG <u>C</u> TTTT <u>C</u> CAAT <u>C</u> TCCATGTC <u>G</u> GCC <u>A</u> C GGAGTTT...
Mod	ATG <u>G</u> TTTT <u>T</u> CCAAT <u>T</u> TCAATGTC <u>A</u> GCA <u>A</u> C GGAGTTT...
Srovnání proteinů CYP1A1	
WT:	ML <u>F</u> PISMSATEF...
Mod:	MA <u>F</u> PISMSATEF...

Při sekvenaci genu vloženého v získaném plasmidu bylo zjištěno, že sekvence genu byla mutována na pozici 171, kdy došlo k záměně izoleucinu na leucin vlivem záměny nukleotidového tripletu ATA za TTA. Jelikož se jednalo o nepopsanou mutaci, která se nevyskytuje v žádné popsané alele, mohla vzniknout při replikaci plasmidu v hostitelské bakterii během mnoha let pokusů nebo při jednom z příprav plasmidu. K sekvenaci bylo odesláno více izolovaných preparátů plasmidu, které byly získány z originálního vzorku, ale u všech byla potvrzena tato mutace. Protože bylo záhodno postupovat v další práci s proteinem co nejbližším lidské formě, byla provedena opravující mutace, kdy byl triplet TTA vyměněn na správný triplet ATA. Toho bylo dosaženo mutací prvního nukleotidu

v tripletu. Následná sekvenace DNA potvrdila úspěšnost mutace a s tímto genem bylo dále pracováno.

Původní plasmid byl vytvořen na počátku 90. let 20. století a od té doby došlo k výraznému posunu v metodice purifikací cytochromů P450 z bakterií. Dříve používané detergenty určené pro solubilizaci membrán již nejsou produkovány (Triton N-101), nebo není doporučeno je používat, jelikož vystupují jako substráty forem cytochromu P450. Také byl k izolacím využit princip afinitní chromatografie, kdy byl jako nejvíce užívaný afinitní element využíván histidinový tag vážící se na afinitní nosič s ionty niklu. Dále bylo rovněž prokázáno, že přidání histidinové kotvy na C-konec proteinu neovlivňuje aktivitu enzymu [147]. Z těchto důvodů byl histidinový tag, tvořený šesti histidiny, vložen i do sekvence DNA genu a tím i do proteinu CYP1A1, což ukazuje obrázek 20. V sekvenci DNA byl změněn i stop triplet TAG na dvojici tripletů TAATGA, jelikož kodon TAG může být ignorován transkribujícím mechanismem bakteriálních kmenů používaných k expresi cytochromů P450. Výsledky této části práce jsou součástí publikace tvořící přílohu č. 3 disertační práce [144].

```

ATGGCTTTTCCAATTTCAATGTCAGCAACGGAGTTTCTTCTGGCCTCTGTCATCTTCTGTCTGGTA
TTCTGGGTAAATCAGGGCCTCAAGACCTCAGGTCCCCAAAGGCCTGAAGAATCCACCAGGGCCATGG
GGCTGGCCTCTGATTGGGCACATGCTGACCCTGGGAAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATG
AGCCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGAATTGGCTCCACACCCCGTGGTGGTGTGCTGAGCGGC
CTGGACACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCGGCAGGGCGATGATTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTAC
ACCTTCACCCCTCATCAGTAATGGTCAGAGCATGTCTTCAGCCCAGACTCTGGACCAGTGTGGGCT
GCCCCGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGGCCTGAAAAGTTTCTCCATTGCCTCTGACCCAGCCTCCTCA
ACCTCCTGCTACCTGGAAGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTGAGGTCTTGATAAGCACGTTGCAGGAG
CTGATGGCAGGGCCTGGGCACTTTAACCCCTACAGGTATGTGGTGGTATCAGTGACCAATGTCATC
TGTGCCATTTGCTTTGGCCGGCGCTATGACCACAACCACCAAGAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTG
AATAATAATTTTCGGGGAGGTGGTTGGCTCTGGAAACCCAGCTGACTTCATCCCTATTCTTCGCTAC
CTACCCAACCCCTTCCCTGAATGCCTTCAAGGACCTGAATGAGAAGTTCTACAGCTTCATGCAGAAG
ATGGTCAAGGAGCACTACAAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATT
GAGCACTGTCAGGAGAAGCAGCTGGATGAGAACGCCAATGTCCAGCTGTCAGATGAGAAGATCATT
AACATCGTCTTGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGACACAGTCACAACCTGCTATCTCCTGGAGCCTC
ATGTATTTGGTGATGAACCCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGAGCTAGACACAGTGATTGGC
AGGTCACGGCGGCCCCGGCTCTCTGACAGATCCCATCTGCCCTATATGGAGGCCTTCATCCTGGAG
ACCTTCCGACACTCTTCCTTCGTCCCTTCACCATCCCCCACAGCACACAAGAGACACAAGTTTG
AAAGGCTTTTACATCCCCAAGGGCGTTGTGTCTTTGTAAACCAGTGGCAGATCAACCATGACCAG
AAGCTATGGGTCAACCCATCTGAGTTCCTACCTGAACGGTTTCTCACCCCTGATGGTGCTATCGAC
AAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGATTATCTTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGATCGGTGAGACCATT
GCCCCGCTGGGAGGTCTTTCTCTTCTGGCTATCCTGCTGCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCACTG
GGCGTGAAGGTGGACATGACCCCCATCTATGGGCTAACCATGAAGCATGCCTGCTGTGAGCACTTC
CAAATGCAGCTGCGCTCTCATCATCATCATCATTAATGA

```

```

MAFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGWPLIGHMLTLGKNPHLALSRM
SQQYGDVLQIRIGSTPVVVLISGLDITRQALVRQGDGDFKGRPDLYTFTLISNGQSMSFSPDSGPVWA
ARRRLAQNGLKSFSIASDPASSTSCYLEEHVSKEAEVLISLQELMAGPGHFNPHYRYVVVSVTNVI

```

CAICFGRRYDHNHQEELLSLVNLNNNFGEVVGSGNPADFIPILRYLPNPSLNAFKDLNEKFYSFMQK
 MVKEHYKTFEKGHIRDITDSLIEHCQEKQLDENANVQLSDEKIINIVLDLFGAGFDTVTTAISWSL
 MYLVMNPRVQRKIQEELDTVIGRSRRPRLSDRSHLPYMEAFIETFRHSSFVPFTIPHSTTRDTSL
 KGFYIPKGRCVFNQWQINHDQKLWVNPSEFLPERFLTPDGAIDKVLSEKVIIFGMGKRKCIGETI
 ARWEVFLFLAILLQRVESVPLGVKVDMTPIYGLTMKHACCEHFQMLRS HHHHHH--

Obr. 20 Sekvence DNA a proteinu CYP1A1 s dodanou histidinovou kotvou

Histidinová kotva je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, stop kodony jsou zobrazeny červeným zbarvením. V sekvenci proteinu jsou zobrazeny pomlčkami

V rámci práce bylo pomocí místně cílené mutagenese tohoto genu připraveno pět plasmidů nesoucích mutantní formy CYP1A1 určené k produkci mutantních proteinů. U dvou mutantních plasmidů byla vybrána záměna bazí následně ústících ve změnu bazických aminokyselin na neutrální (R135Q a K454Q), u dalších dvou pozic byla naopak provedena záměna neutrálních aminokyselin na bazické (Q139R a Q293R). Pátý plasmid určený na jinou část práce nesl mutant v pozici S122A. Pozice záměn v sekvenci proteinu ukazuje obrázek 21.

MAFPISMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGWPLIGHMLTLGKNPHL
 ALSRMSQQYGDVLQIRIGSTPVVVLSSGLDITRQALVRQGDDFKGRPDLYTFTLISNGQSMS
 FSPDSGPVWAARERLAQNGLSFSIASDPASSTSCYLEEHVSKEAEVLISLQELMAGPGH
 FNPYRYVVSVTNVICAICFGRRYDHNHQEELLSLVNLNNNFGEVVGSGNPADFIPILRYLP
 NPSLNAFKDLNEKFYSFMQK MVKEHYKTFEKGHIRDITDSLIEHCQEKOLDENANVQLSDE
 KIINIVLDLFGAGFDTVTTAISWSL MYLVMNPRVQRKIQEELDTVIGRSRRPRLSDRSHLP
 YMEAFIETFRHSSFVPFTIPHSTTRDTSLKGFYIPKGRCVFNQWQINHDQKLWVNPSEF
 LPERFLTPDGAIDKVLSEKVIIFGMGKRKCIGETIARWEVFLFLAILLQRVESVPLGVKVD
 MTPIYGLTMKHACCEHFQMLRS HHHHHH--

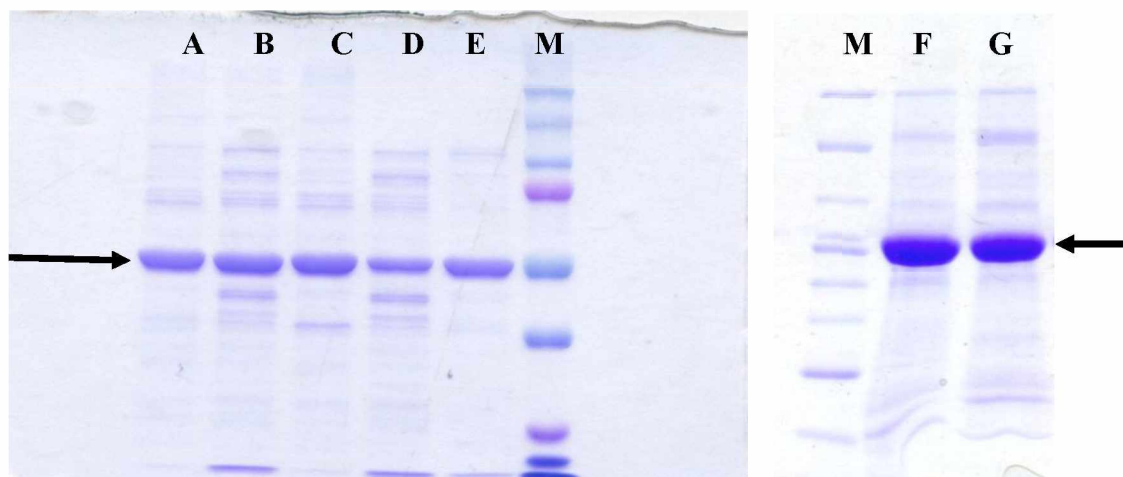
Obr. 21 Pozice mutovaných aminokyselin v přirozeném proteinu CYP1A1

Správnost všech vytvořených plasmidů byla ověřena sekvenací DNA. Proteiny byly exprimovány v bakteriích a následně izolován z bakteriálních membrán. Charakteristiky izolovaných preparátů shrnuje tabulka 16 na následující straně. Produkce wild-type formy byla provedena ve 4 litrech kultury, zatímco exprese mutantních proteinů byla provedena ve dvou litrech proteinu. Produkce přirozené formy CYP1A1 poskytla signifikantně vyšší množství proteinu, než je popisováno v literatuře. Vyšší produkce dosáhl i mutant Q293R, zbylé mutantní proteiny dosáhly běžných hodnot produkce.

Tab. 16 Charakteristika izolovaných forem proteinu CYP1A1

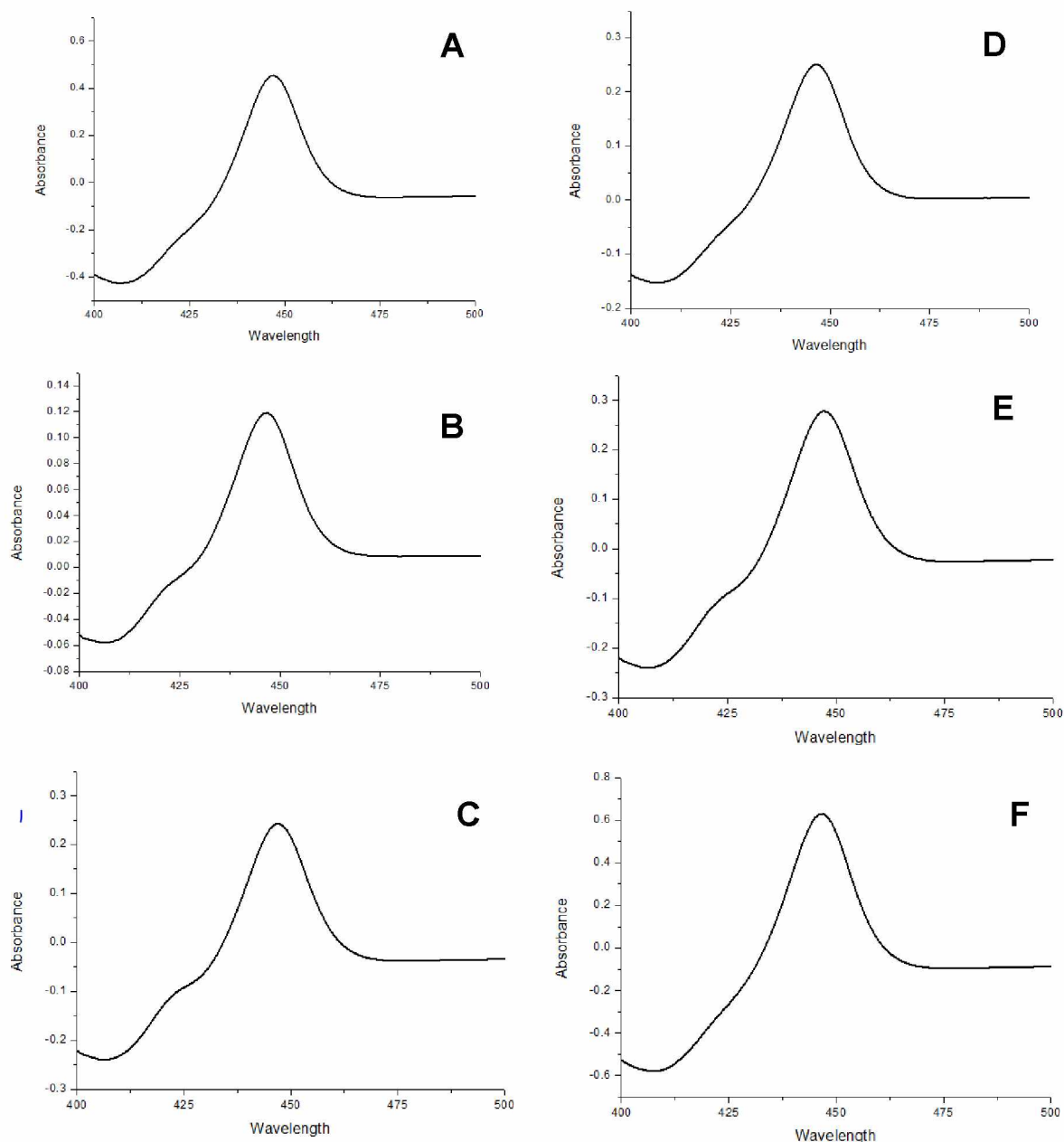
Typ CYP1A1	Koncentrace CYP [nmol/ml]	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Specifický obsah [nmol CYP/mg proteinu]	Výtěžek z kultury [nmol/l]
Wild-type	56,5	4,9	10,8	103
R135Q	18,5	2,6	7,1	25,9
Q139R	30,6	2,9	10,6	23,8
Q293R	27,3	3,1	8,8	52
K454Q	33,2	3	11	25,7
S122A	79	7,4	10,6	98,8

Čistotu preparátů ukazují obrázek 22 zobrazující rozdělení vzorků izolovaných proteinů na SDS-PAGE.

**Obr. 22 SDS-PAGE purifikovaných forem CYP1A1**

Rozdělení bylo provedeno s využitím 10% gelu; A, F - Přirozená forma; B – mutantní forma R135Q; C – mutantní forma Q139R; D – mutantní forma Q293R; E – mutantní forma K454Q; rozděleno bylo 100 pmol proteinu; šipkou je naznačena pozice získaných proteinů

Proteiny byly podrobeny spektrální analýze ve snaze získat informace o případné přítomnosti nefunkční formy cytochromu P450. Ta se při měření spektra redukováného proteinu s navázaným oxidem uhelnatým projevuje absorpčním maximem při 420 nm. Příslušná spektra připravených proteinových preparátů jsou zobrazena na obrázku 23 na následující straně. Jak je možno pozorovat, u všech získaných preparátů byl cytochrom P450 majoritně přítomen ve spektrálně správné formě. Část výsledků této části disertační práce je součástí publikace, která tvoří přílohu č. 3 disertační práce [144].



Obr. 23 Spektra redukováných forem CYP1A1 s navázaným oxidem uhelnatým
Proteiny byly před měřením 10x ředěny. A - Přirozená forma; B – mutant R135Q; C – mutant Q139R; D – mutant Q293R; E – mutant K454Q; F – mutant S122A

4.1.2 Příprava plasmidu a heterologní exprese forem CYP1A2

Původní plasmid pCW nesoucí gen *CYP1A2* byl také získán ze spolupracující laboratoře z Vanderbilt University. Tento gen byl již upraven pro umožnění exprese proteinu v bakterii *Escherichia coli*. Úpravy u tohoto genu spočívají ve větších změnách samotné sekvence vzniklého proteinu. Membránová kotva lokalizovaná na N-konci proteinu je nahrazena sekvencí 12 nových aminokyselin, která byla poprvé použita pro

expresi hovězí formy CYP17A1, z jehož membránové kotvy byla upravená sekvence odvozena [148]. Tato úprava u CYP1A2 nahrazuje původních 20 aminokyselin. Změny se nedotýkají jen proteinové sekvence, protože upravená sekvence obsahuje také změny DNA bází pro snížení pravděpodobnosti tvorby vlásenek na transkribované mRNA [134]. Porovnání počátku přirozené sekvence genu a proteinu s upraveným počátkem ukazuje tabulka 17.

Tab. 17 Srovnání počátků genů a exprimovaných proteinů CYP1A2.

Změny jsou vyznačeny podtržením. Vytvořeno s využitím informací z [134].

Srovnání genů <i>CYP1A2</i>	
WT:	<u>ATGGCATTTGTCCCAGTCTGTTCCCTTCTCGGCCACAGAGCTTCTCCTGGCCT</u> <u>CTGCCATCTTC</u>
Mod:	<u>ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTG</u> <u>TTC</u>
Srovnání proteinů CYP1A2	
WT:	MALSQSVFSA TE LLLSAIF...
Mod:	<u>MALL</u> LA V FLF...

Z důvodů uvedených u přípravy plasmidu s genem *CYP1A1* byl do sekvence genu CYP1A2 vložen opět histidinový tag, tvořený šesti histidiny, což ukazuje obrázek 24. V sekvenci DNA byl změněn i stop triplet TAG na dvojici tripletů TAATGA, jelikož kodon TAG může být ignorován transkribujícím mechanismem bakteriálních kmenů používaných k expresi cytochromů P450. Část výsledků této části práce je součástí publikace, která tvoří přílohu č. 3 disertační práce [144].

ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTGTTCTGCCTGGTATTCTGGGTGCTCAAGGGTTTGAGGCCTCGGGTCC
CCAAAGGCCTGAAAAGTCCACCAGAGCCATGGGGCTGGCCCTTGCTCGGGCATGTGCTGACCCTGGGGAAGAA
CCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCGCTACGGGGACGTCTGTCAGATCCGCATTGGCTCCACGCCC
GTGCTGGTGCTGAGCCGCTGGACACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCGGCAGGGCGACGATTTCAAGGGCCGGC
CTGACCTCTACACCTCCACCCTCATCACTGATGGCCAGAGCTTGACCTTCAGCACAGACTCTGGACCGGTGTG
GGCTGCCCCGCGCGCCTGGCCCAGAATGCCCTCAACACCTTCTCCATCGCCTCTGACCCAGCTTCCTCATCC
TCCTGCTACCTGGAGGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTAAGGCCCTGATCAGCAGGTTGCAGGAGCTGATGGCAG
GGCTGGGCACCTTCGACCCTTACAATCAGGTGGTGGTGTGTCAGTGGCCAACGTCATTGGTGCCATGTGCTTCGG
ACAGCACTTCCCTGAGAGTAGCGATGAGATGCTCAGCCTCGTGAAGAACACTCATGAGTTCGTGGAG
ACTGCCTCCTCCGGGAACCCCTGGACTTCTTCCCCATCCTTCGCTACCTGCCTAACCCTGCCCTG
CAGAGGTTCAAGGCCTTCAACCAGAGGTTCTGTGGTTCTGTCAGAAAACAGTCCAGGAGCACTAT
CAGGACTTTGACAAGAACAGTGTCCGGGACATCACGGGTGCCCTGTTCAAGCACAGCAAGAAGGGG
CCTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCACAGGAGAAGATTGTCAACCTTGTCAATGACATCTTTGGA
GCAGGATTTGACACAGTCACCACAGCCATCTCCTGGAGCCTCATGTACCTTGTGACCAAGCCTGAG
ATACAGAGGAAGATCCAGAAGGAGCTGGACACTGTGATTGGCAGGGAGCGGCGGCCCGGCTCTCT
GACAGACCCAGCTGCCCTACTTGGAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACACTCCTCCTTCTTG
CCCTTCACCATCCCCACAGCACAACAAGGGACACAACGCTGAATGGCTTCTACATCCCCAAGAAA
TGCTGTGTCTTCGTAAACAGTGGCAGGTCAACCATGACCCAGAGCTGTGGGAGGACCCCTCTGAG

TTCCGGCCTGAGCGGTTTCCTCACCGCCGATGGCACTGCCATTAACAAGCCCTTGAGTGAGAAGATG
 ATGCTGTTTGGCATGGGCAAGCGCCGGTGTATCGGGGAAGTCCTGGCCAAGTGGGAGATCTTCCTC
 TTCCTGGCCATCCTGCTACAGCAACTGGAGTTCAGCGTGCCGCCGGGCGTGAAAGTCGACCTGACC
 CCCATCTACGGGCTGACCATGAAGCACGCCCGCTGTGAACATGTCCAGGCGCGGCTGCGCTTCTCC
 ATCAATCATCATCATCATCATTAATGA

MALLLAVFLFCLVFWVLKGLRPRVPKGLKSPPEPWGWPLLGHVLTGLGNPHLALSRMSQRYGDVLQ
 IRIGSTPVLVLSRLDTIRQALVRQGDDFKGRPDLYTSTLITDGQSLTFSTDSGPVWAARRRLAQN
 LNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQELMAGPGHFDYPNQVVSVANVIGAMCFGQHF
 PESSDEMLSLVKNTHFVETASSGNPLDFFPILRYLPNPALQRFKAFNQRFWFLQKTVQEHYQDF
 DKNSVRDITGALFKHSHKGPASGNLIPQEKIVNLVNDIFGAGFDTVTTAISWSLMYLVTKPEIQR
 KIQKELDTVIGRERRPRLSDRPQLPYLEAFIETFRHSSFLPFTIPHSTTRDRTLNGFYIPKKCCV
 FVNQWQVNHDPPELWEDPSEFRPERFLTADGTAINKPLSEKMMLFGMGKRCIGEVLAKEIFLFLA
 ILLQQLFESVPPGVKVDLTPIYGLTMKHARCEHVQARLRFSINHHHHHH--

Obr. 24 Sekvence DNA a proteinu CYP1A2 s dodanou histidinovou kotvou

Histidinová kotva je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, stop kodony jsou zobrazeny červeným zbarvením. V sekvenci proteinu jsou zobrazeny pomlčkami

V rámci práce bylo i u tohoto genu připraveno pět plasmidů nesoucích mutantní formy a to opět pomocí místně cílené mutagenese tohoto genu. U tří mutantních genů byla vybrána záměna bazí následně ústících ve změnu bazických aminokyselin na neutrální (R137Q; R296Q a K455Q), u jednoho byla naopak provedena záměna neutrálních aminokyselin na bazické (Q141R). Pátý plasmid určený na jinou část práce nesl mutant v pozici T124V. Pozice záměn v sekvenci proteinu ukazuje obrázek 25, přičemž číselné označení pozic odpovídá dle konvence přirozené formě a nikoliv N-terminálně modifikované formě proteinu.

MALLLAVFLFCLVFWVLKGLRPRVPKGLKSPPEPWGWPLLGHVLTGLGNPHLALSRMSQRY
 GDVLQIRIGSTPVLVLSRLDTIRQALVRQGDDFKGRPDLYTSTLITDGQSLTFSTDSGPVW
 AARRRLAQNALNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQELMAGPGHFDYPNQVVV
 SVANVIGAMCFGQHFPESSDEMLSLVKNTHFVETASSGNPLDFFPILRYLPNPALQRFKA
 FNQRFWFLQKTVQEHYQDFDKNSVRDITGALFKHSHKGPASGNLIPQEKIVNLVNDIFG
 AGFDTVTTAISWSLMYLVTKPEIQRKIQKELDTVIGRERRPRLSDRPQLPYLEAFIETFR
 HSSFLPFTIPHSTTRDRTLNGFYIPKKCCVFNQWQVNHDPPELWEDPSEFRPERFLTADGT
 AINKPLSEKMMLFGMGKRCIGEVLAKEIFLFLAILLQQLFESVPPGVKVDLTPIYGLTM
 KHARCEHVQARLRFSINHHHHHH--

Obr. 25 Pozice mutovaných aminokyselin v přirozeném proteinu CYP1A2

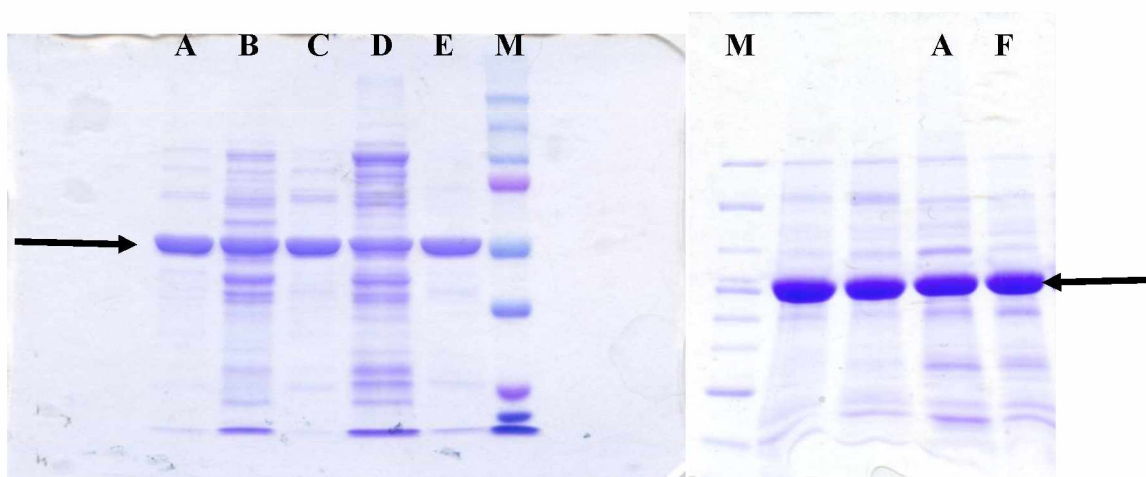
Správnost všech vytvořených plasmidů byla ověřena sekvenací DNA. Proteiny byly exprimovány v bakteriích a následně izolován z bakteriálních membrán. Charakteristiky izolovaných preparátů shrnuje tabulka 18 na následující straně. Produkce wild-type formy byla provedena ve 4 litrech kultury, zatímco exprese mutantních proteinů byla provedena

ve 2 litrech kultury. Množství přirozené formy CYP1A2 získané expresí bylo výrazně vyšší než u všech zkonstruovaných mutantů. Nejvýrazněji se pravděpodobný vliv změny struktury projevil u mutantu R137Q. Nejen že produkce a izolace proteinu poskytla nízké výtěžky, ale tento protein během počátečních purifikací precipitoval. Proto byla jeho izolace několikrát opakována k získání preparátu uspokojivých vlastností.

Tab. 18 Charakteristika izolovaných forem proteinu CYP1A2

Typ CYP1A2	Koncentrace CYP [nmol/ml]	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Specifický obsah [nmol CYP/mg proteinu]	Výtěžek z kultury [nmol/l]
Wild-type	52	4,5	11,6	206
R137Q	5,3	0,9	5,9	10,6
Q141R	65,4	6,1	10,7	72
R296Q	35,5	6,7	5,3	103
K455Q	44,5	4	11,1	114
T124V	42	4,8	8,7	46,2

Čistotu preparátů ukazuje obrázek 26 zobrazující rozdělení vzorků izolovaných proteinů na SDS-PAGE.

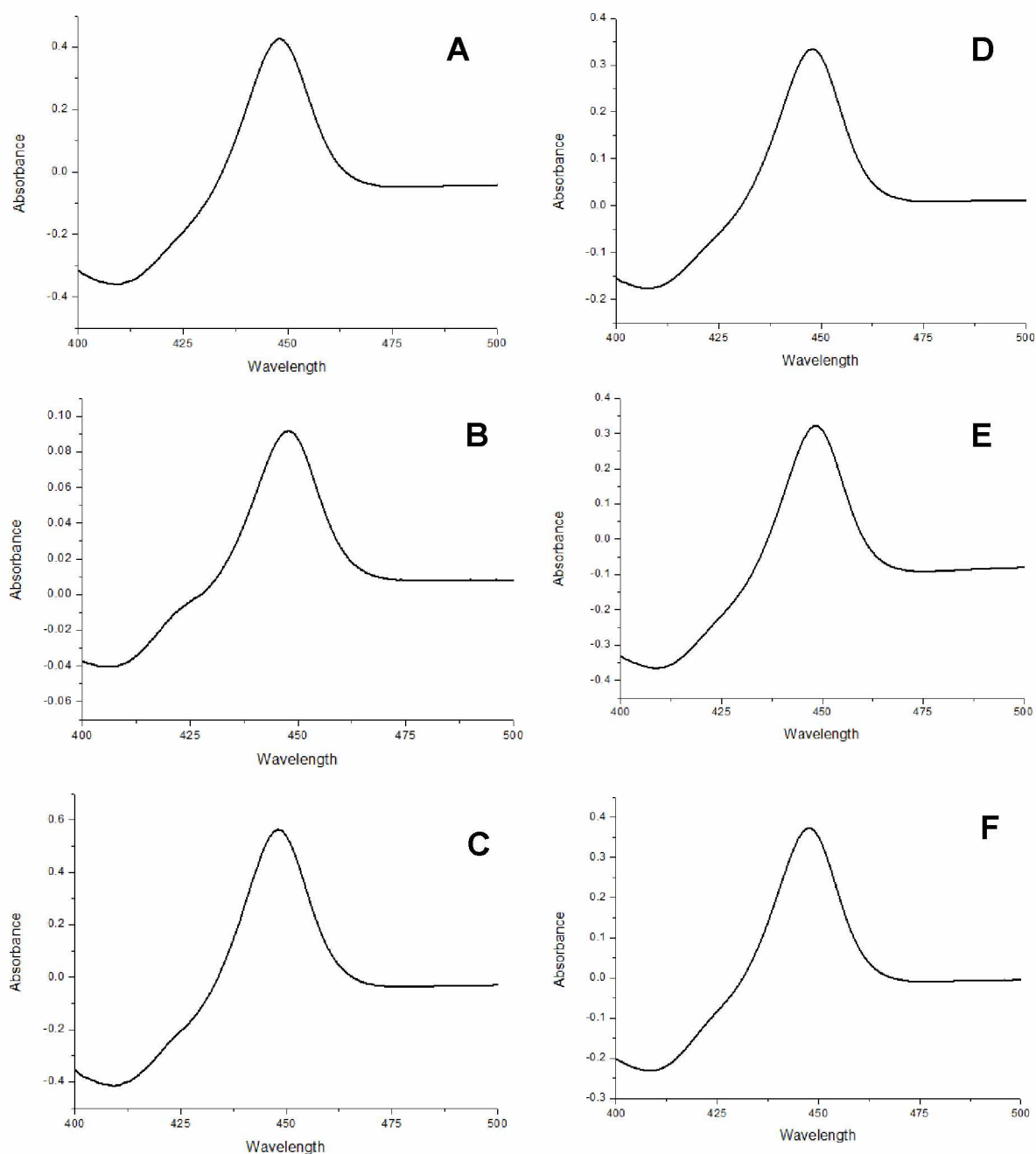


Obr. 26 SDS-PAGE purifikovaných forem CYP1A2

Rozdělení bylo provedeno s využitím 10% gelu. A - Přirozená forma; B – mutant R137Q; C – mutant Q141R; D – mutant R296Q; E – mutant K455Q; F – mutant T124V; šipkami jsou naznačeny pozice získaných proteinů

Proteiny byly podrobeny spektrální analýze ve snaze získat informace o případné přítomnosti nefunkční formy cytochromu P450. Ta se při měření spektra redukováného

proteinu s navázaným oxidem uhelnatým projevuje absorpčním maximem při 420 nm. Příslušná spektra připravených proteinových preparátů jsou zobrazena na obrázku 27. Jak je možno pozorovat, u všech získaných preparátů byl cytochrom P450 majoritně přítomen ve spektrálně správné formě.



Obr. 27 Spektra redukováných forem CYP1A2 s navázaným oxidem uhelnatým
Proteiny byly před měřením 10x ředěny, mutant R137Q byl ředěn 5x. A - Původní forma; B – mutant R137Q; C – mutant Q141R; D – mutant R296Q; E – mutant K455Q; F – mutant T124V

4.1.3 Příprava plasmidů a heterologní exprese forem CYP1B1

Gen *CYP1B1* byl získán z databáze Harvard PlasmID a následně byl upraven a přenesen do plasmidu pCW. Úprava genu byla provedena pro umožnění exprese proteinu v bakterii *Escherichia coli* [149]. Úprava provedená na 5'-konci genu se v proteinu projevuje eliminací dvou aminokyselin, což ukazuje tabulka 19.

Tab. 19 Srovnání počátků genů a exprimovaných proteinů CYP1B1.

Změny jsou vyznačeny podtržením. Vytvořeno s využitím informací z [149].

Srovnání genů <i>CYP1B1</i>	
WT	ATGGGCACCAGCCTCAGCCCGAACGACCCTTGGCCGCTAAAC
Mod	<u>ATGCTTTCTCCAAATGATCCAT</u> TGGCCGCTAAAC
Srovnání proteinů CYP1B1	
WT:	MGTSLSNPDPWPLN...
Mod:	M--SLSNPDPWPLN...

Z důvodů uvedených u přípravy plasmidu s genem *CYP1A1* byl do sekvence genu *CYP1B1* vložen opět histidinový tag, tvořený šesti histidiny, což ukazuje obrázek 28. V sekvenci DNA byl opět změněn stopkodon na dvojici tripletů TAATGA. Genu získaný z databáze představoval alelu *CYP1B1**3 obsahující mutaci tripletu CTG na GTG projevující se v proteinu mutací L432V. Jelikož byla pro srovnání proteinů záhodno postupovat s přirozenou formou proteinu, byla mutace opravena mutací prvního nukleotidu ve zmiňovaném tripletu, což vlastně znamenalo převod na alelu *CYP1B1**1. Následná sekvenace DNA potvrdila úspěšnost mutace.

```
ATGCTTTCTCCAAATGATCCATGGCCGCTAAACCCGCTGTCCATCCAGCAGACCACGCTCCTGCTA
CTCCTGTCTGGTGTCTGGCCACTGTGCATGTGGGCCAGCGGCTGCTGAGGCAACGGAGGCGGCAGCTC
CGGTCCGCGCCCCCGGGCCCGTTTTCGTGGCCACTGATCGGAAACGCGGCGGCGGTGGGCCAGGCG
GCTCACCTCTCGTTCGCTCGCCTGGCGCGGCGCTACGGCGACGTTTTCAGATCCGCCTGGGCAGC
TGCCCCATAGTGGTGTGAATGGCGAGCGCGCCATCCACCAGGCCCTGGTGCAGCAGGGCTCGGCC
TTCGCCGACCGGCCGGCCTTCGCCTCCTTCCGTGTGGTGTCCGGCGGCCGCGAGCATGGCTTTCGGC
CACTACTCGGAGCACTGGAAGGTGCAGCGGCGCGCAGCCACAGCATGATGCGCAACTTCTTCACG
CGCCAGCCGCGCAGCCGCCAAGTCCTCGAGGGCCACGTGCTGAGCGAGGCGCGCGAGCTGGTGGCG
CTGCTGGTGCAGCGGCGAGCGCGGACGGCGCCTTCCTCGACCCGAGGCGGCTGACCGTCTGGCCGTG
GCCAACGTTCATGAGTGCCGTGTGTTTCGGCTGCCGCTACAGCCACGACGACCCCGAGTTCCGTGAG
CTGCTCAGCCACAACGAAGAGTTCGGGCGCACGGTGGGCGCGGGCAGCCTGGTGGACGTGATGCC
TGGCTGCAGTACTTCCCCAACCCGGTGCACACCGTTCCTCCGCGAATTCGAGCAGCTCAACCGCAAC
TTCAGCAACTTCATCCTGGACAAGTTCCTGAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCCGGGGCCGCCCCC
CGCGACATGATGGACGCCTTTATCCTCTCTGCGGAAAAGAAGGCGGCCGGGGACTCGCACGGTGGT
```

GGCGCGCGGCTGGATTTGGAGAACGTACCGGCCACTATCACTGACATCTTCGGCGCCAGCCAGGAC
 ACCCTGTCCACCGCGCTGCAGTGGCTGCTCCTCCTCTTACCAGGTATCCTGATGTGCAGACTCGA
 GTGCAGGCAGAATTGGATCAGGTCGTGGGGAGGGACCGTCTGCCTTGTATGGGTGACCAGCCCAAC
 CTGCCCTATGTCCTGGCCTTCCTTTATGAAGCCATGCGCTTCTCCAGCTTTGTGCCTGTCACTATT
 CCTCATGCCACCACTGCCAACACCTCTGTCTTGGGCTACCACATTCCCAAGGACACTGTGGTTTTT
 GTCAACCAGTGGTCTGTGAATCATGACCCAAGTGAAGTGGCCTAACCCGGAGAACTTTGATCCAGCT
 CGATTCTTGGACAAGGATGGCCTCATCAACAAGGACCTGACCAGCAGAGTGATGATTTTTTTCAGTG
 GGCAAAAGGCGGTGCATTGGCGAAGAACTTTCTAAGATGCAGCTTTTTCTCTTCATCTCCATCCTG
 GCTCACCAGTGCGATTTTCAGGGCCAACCCAAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTTCAGTTATGGTCTA
 ACCATTAAACCCAAAGTCATTTAAAGTCAATGTCACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGT
 GCTGTCCAAAATTTACAAGCCAAGGAACTTGCCAAATCATCATCATCATCATTAATGA

MLSPNDPWPLNPLSIQQTLLLLLLSVLATVHVGQRLLRQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAVQQA
 AHLSEFARLARRYGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQGSFAFADRPFAFASFRVVSNGGRSMAFG
 HYSEHWKVQRRAAHSMMRNFFTRQPRSRQVLEGHVLEARELVALLVRGSADGAFDPRPLTVVAV
 ANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSLVDVMPWLQYFPNPVRTVVFREFEQNLNRN
 FSNFILDKFLRHCESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLDLENVPATITDIFGASQD
 TLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAEQVVGDRDLPCMGDQPNLPYVLAFLYEAMRFSSFPVPTI
 PHATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHDPLKWPNPENFDPARFLDKDGLINKDLTSRVMI FSV
 GKRRICIGEELSKMQLFLFISILAHQCDFRANPNEPAKMNF SYGLTIKPKSFKVNVTLRESMELLD
 SAVQNLQAKETCQHSHHHHH--

Obr. 28 Sekvence DNA a proteinu CYP1B1 s dodanou histidinovou kotvou

Histidinová kotva je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, stop kodony jsou zobrazeny červeným zbarvením. V sekvenci proteinu jsou zobrazeny pomlčkami

V rámci práce byl připraven plasmid nesoucí mutantní formu A133S a to opět pomocí místně cílené mutagenese tohoto genu. Pozice záměny v sekvenci proteinu ukazuje obrázek 29, přičemž číselné označení pozice odpovídá dle konvence přirozené formě a nikoliv N-terminálně modifikované formě proteinu.

MLSPNDPWPLNPLSIQQTLLLLLLSVLATVHVGQRLLRQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAA
 AVQQAHLSEFARLARRYGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQGSFAFADRPFAFASFRV
 VSGGRSMAFGHYSEHWKVQRRAAHSMMRNFFTRQPRSRQVLEGHVLEARELVALLVRGSA
 DGAFLDPRPLTVVAVANVMSAVCFGCRYSHDDPEFRELLSHNEEFGRTVGAGSLVDVMPWL
 QYFPNPVRTVVFREFEQNLNRNFSNFILDKFLRHCESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDS
 HGGGARLDLENVPATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAEQVVGDRDL
 PCMGDQPNLPYVLAFLYEAMRFSSFPVPTIPHATTANTSVLGYHIPKDTVVFVNQWSVNHD
 PLKWPNPENFDPARFLDKDGLINKDLTSRVMI FSVGKRRICIGEELSKMQLFLFISILAHQC
 DFRANPNEPAKMNF SYGLTIKPKSFKVNVTLRESMELLD SAVQNLQAKETCQHSHHHHH--

Obr. 29 Pozice mutované aminokyseliny v přirozeném proteinu CYP1B1

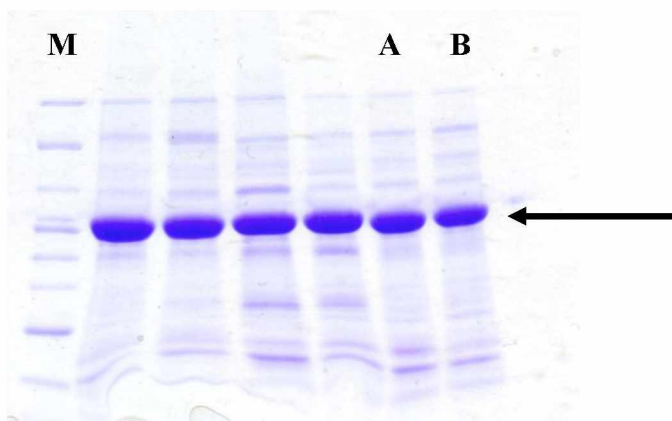
Proteiny byly exprimovány v bakteriích a následně izolovány z bakteriálních membrán. Charakteristiky izolovaných preparátů shrnuje tabulka 20 na následující straně. Produkce přirozené formy byla provedena ve 4 litrech kultury, zatímco exprese mutantního

proteinů byla provedena ve 2 litrech kultury. Množství získané přirozené formy CYP1B1 bylo vyšší než mutantu.

Tab. 20 Charakteristika izolovaných forem proteinu CYP1B1

Typ CYP1B1	Koncentrace CYP [nmol/ml]	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Specifický obsah [nmol CYP/mg proteinu]	Výtěžek z kultury [nmol/l]
WT	34,7	3,5	9,9	91,75
A133S	31	3,3	9,3	55,8

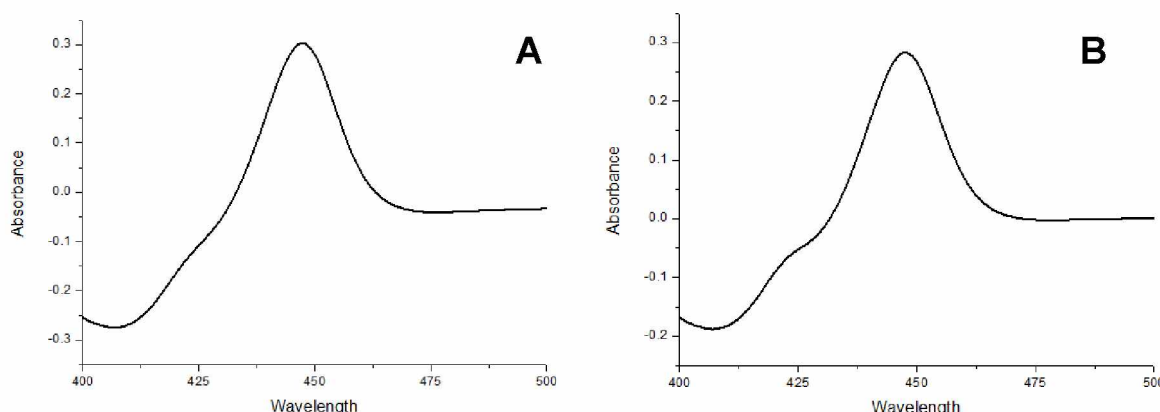
Čistotu preparátů ukazuje obrázek 30 zobrazující rozdělení vzorků izolovaných proteinů na SDS-PAGE.



Obr. 30 SDS-PAGE purifikovaných forem CYP1B1

Rozdělení bylo provedeno s využitím 10% gelu. A - Přirozená forma; B – mutant A133S; ostatní vzorky představují jiné proteiny z rodiny CYP1; šipkou je naznačena pozice získaných proteinů

Proteiny byly podrobeny spektrální analýze ve snaze získat informace o případné přítomnosti špatně složené formy cytochromu P450. Příslušná spektra připravených proteinových preparátů jsou zobrazena na obrázku 31 na následující straně. Jak je možno pozorovat, u získaných preparátů byl cytochrom P450 majoritně přítomen ve spektrálně správné formě.



Obr. 31 Spektra redukováných forem CYP1B1 s navázaným oxidem uhelnatým. Proteiny byly před měřením 10x ředěny. A - Přirozená forma; B – mutant A133S

Výsledky této části práce jsou součástí publikace, která tvoří přílohu č. 3 disertační práce [144].

4.1.4 Příprava plasmidů a heterologní exprese ostatních forem cytochromů P450

Geny lidských cytochromů P450 *CYP2B6* (mutant H172Q a R262K), *CYP2C8* a *CYP2D6* byly získány z databáze Harvard PlasmID databáze a gen lidského *CYP2S1* zaklonovaný v plasmidu pCW byl získán darem od prof. P.F. Guengeriche z Vanderbilt University z USA. Geny *CYP2B6* (mutant H172Q a R262K), *CYP2C8* a *CYP2D6* byly upraveny a přeneseny do plasmidu pCW se změnami popsány v [150, 151, 152]. Úpravy genu byly provedeny pro umožnění exprese proteinu v bakterii *Escherichia coli* a také dodáním histidinového tagu pro případné budoucí purifikace. Úpravy provedené na 5'-koncích genů *CYP2B6* (mutant H172Q a R262K), *CYP2C8* a *CYP2D6* a jejich projevy v sekvencích proteinů jsou shrnuty v tabulce 21. Změny se projevovaly buď změnou jedné aminokyseliny (*CYP2D6*), dodáním sekvence hovězí CYP17A1 (*CYP2B6*) nebo komplexní změnou membránové kotvy (*CYP2C8*).

Tab. 21 Srovnání počátků genů a exprimovaných dalších cytochromů P450.

Změny jsou vyznačeny podtržením. WT označuje přirozenou formu, MOD označuje formu modifikovanou. Vytvořeno s využitím informací z [150, 151, 152].

CYP2B6	DNA – wt	ATGGA ^{ACTCAGCGTCCTCCTCTTCCTTGCA} . . .
	DNA – mod	ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTTGCA . . .

	protein – wt	MELSVLLFLA...
	protein – mod	M <u>ALLL</u> AVFLA...
CYP2D6	DNA – wt	ATGGGGCTAGAAGCACTGGTGCCCCTG...
	DNA – mod	ATGG <u>GCTCTT</u> GAAGCACT <u>TGTACC</u> ACTG...
	protein – wt	MGLEAVLPL...
	protein – mod	M <u>A</u> LEAVLPL...
CYP2C8	DNA – wt	ATGGAACCTTTTGTGGTCCTGGTGCTGTGTCTCTCTTTTATGCTTCTCTTT...
	DNA – mod	ATGG <u>GCTCTGTT</u> ATAG <u>CAGTTTTT</u> CTGGGTCTCTCCTGTTTGCTTCTCCTT...
	protein – wt	MEPFVVLVLCLSFMLLFS...
	protein – mod	M <u>ALLL</u> AVFL <u>GLSCLLLS</u> ...

Byla provedena jejich exprese v bakteriích *Escherichia coli*. Tyto proteiny nebyly izolovány, byly využity pouze k měření CO spektra cytochromů P450 v bakteriálních buňkách. Výjimkou byl CYP2S1. Výsledky z heterologní exprese, izolace CYP2S1 a jeho charakterizace jsou součástí publikace, která tvoří přílohu č. 4 disertační práce [124].

4.1.5 Příprava plasmidů a heterologní exprese forem cyt b₅

Jako původní gen lidského membránového cytochromu b₅ byl použit gen připravený genovou syntézou s úpravou kodónů pro bakterie odvozené od původního kmene K-12. Tento gen byl vložen v plasmidu pET-22b a byl připraven v rámci diplomové práce Mgr. Terezy Hálkové [153].

Z důvodu přípravy vyššího množství mutantních forem proteinu a časové úspory při izolaci byla na N-terminální konec proteinu přidána histidinová kotva, které předchází dvojice aminokyselin methionin a alanin. Methionin slouží jak o počáteční bod translace mRNA, alanin slouží jako aminokyselina zvyšující expresi proteinu. Samotná histidinová kotva je předřazena původnímu startovnímu methioninu a skládá se ze 4 histidinů. Tento postup byl zvolen již na počátku devadesátých let minulého století k získání rekombinantní lidské a potkaní formy cyt b₅ z bakterií [96] a je stále využíván [109]. DNA sekvenci pozměněného genu a sekvenci proteinu ukazuje obrázek 32.

ATGGCTCATCATCATCATATGGCGGAACAGTCTGACGAAGCGGTAAATACTACACCCTGGAAGAA
ATCCAGAAACACAACCACTCTAAATCTACCTGGCTGATCCTGCACCACAAAGTTTACGACCTGACC
AAATTCTGGAAGAACACCCGGGTGGTGAAGAAGTTCTGCGTGAACAGGCGGGTGGTGACGCGACC
GAAACTTCGAAGACGTTGGTCACTCTACCGACGCGCGTGAAATGTCTAAAACCTTCATCATCGGT

GAAGTGCACCCGGACGACCGTCCGAACTGAACAAACCGCCGGAACCCCTGATCACCACCATCGAC
TCTTCTTCTTCTTGGTGGACCAACTGGGTATCCCGGCGATCTCTGCGGTTGCGGTTGCGCTGATG
TACCGTCTGTACATGGCGGAAGACTAA

MAHHHHMAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHHKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQAGG DAT
ENFEDVGHSTDAREMSKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITTIDSSSSWWTNWVIPAISAVAVALM
YRLYMAED-

Obr. 32 Sekvence DNA a proteinu cytochromu b₅ s dodanou histidinovou kotvou

Histidinová kotva je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, stop kodony jsou zobrazeny červeným zbarvením. V sekvenci proteinu jsou zobrazeny pomlčkami

Upravená sekvence genu byla vložena opět do plasmidu pET-22b a vzniklý plasmid byl použit jako templát pro místně cílenou mutagenézi. Tou byla připravena sada dalších plasmidů nesoucích mutantní geny v níže komentovaných a na obrázku 33 zobrazených pozicích. Číslování mutovaných pozic je uvedeno vzhledem k původnímu počátečnímu methioninu, který následuje za histidinovou kotvou

MAHHHHMAEQSDEAVKYYTLEEIQKHNHNSKSTWLIILHHKVYDLTKFLEEHPGGEEVLREQA
GGIATENFEDVGHSTDAREMSKTFIIGELHPDDRPKLNKPPETLITTIDSSSSWWTNWVIP
AISAVAVALMYRLYMAED-

Obr. 33 Zobrazení mutovaných pozic forem cytochromu b₅ na sekvenci přirozené formy

Modrým podbarvením jsou zobrazeny pozice nesoucí jako původní aminokyselinu kyselinu glutamovou, zeleným zbarvením jsou podbarveny pozice nesoucí jako původní aminokyselinu kyselinu asparagovou. Mutace valinu je zobrazena žlutě.

Drtivá většina mutací vedla k výměně záporně nabitě aminokyseliny za neutrální aminokyselinu. Byly také připraveny dva mutantní geny poskytující proteiny nesoucí dvojistou mutaci ve dvojicích sousedících aminokyselin. Jedinou odlišnou mutací byla záměna valinu za kyselinu asparagovou. Celkem byla připravena sada mutantních gen poskytujících proteiny nesoucí tyto mutace:

- Záměna kyseliny glutamové za glutamin: E42Q, E43Q, E42/43Q; E49Q; E48Q; E48/49Q; E61Q
- Záměna kyseliny asparagové za asparagin: D58N; D65N; D71N
- Záměna valinu za kyselinu asparagovou: V66D

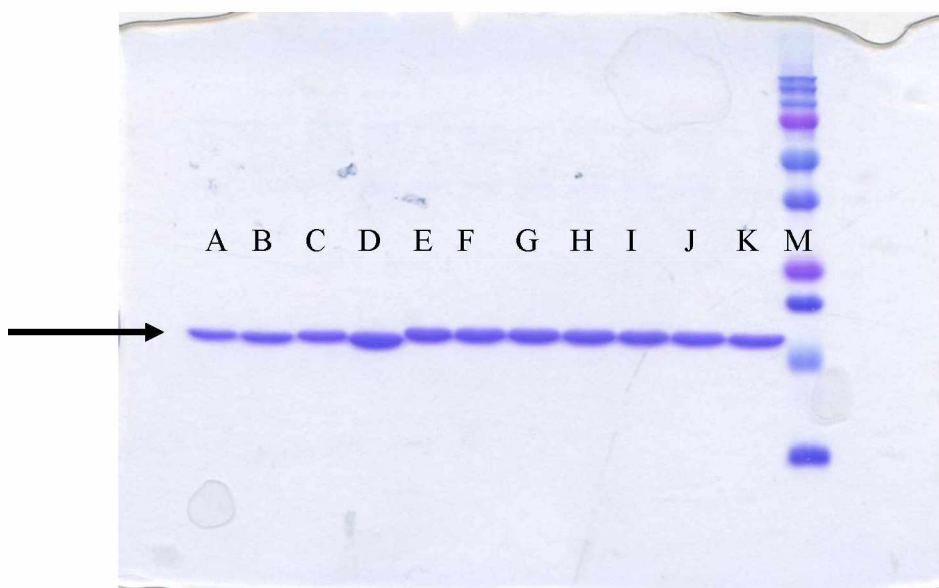
DNA sekvence plasmidů připravených místně cílenou mutagenezí byla ověřena provedením a vyhodnocením sekvenace DNA.

Plasmidy byly použity k produkci proteinů v bakteriálním systému. Získané bakteriální membrány posloužily jako zdroj k purifikaci membránových proteinů. Koncentrace forem cytochromu b_5 byly následně získány pomocí spektrální analýzy. Výsledné koncentrace forem cyt b_5 ukazuje tabulka 22. Bohužel, ani opakovaná produkce mutantní formy V66D neposkytla protein nesoucí hem. Je tedy pravděpodobné, že nedošlo ke správnému složení proteinu. Proto s ním nebylo pokračováno v další práci.

Tab. 22 Charakteristika produkce forem cytochromu b_5

Forma cyt b_5	Koncentrace cyt b_5 ve finálním preparátu [nmol/ml]	Výtěžek [nmol/litr kultury]
Přirozená forma	480	960
E42Q	156	328
E43Q	175	298
E42/43Q	155	388
E48Q	332	446
E49Q	527	1475
E48/49Q	170	432
D58N	320	480
E61Q	378	1135
D65N	511	1226
D71N	214	406

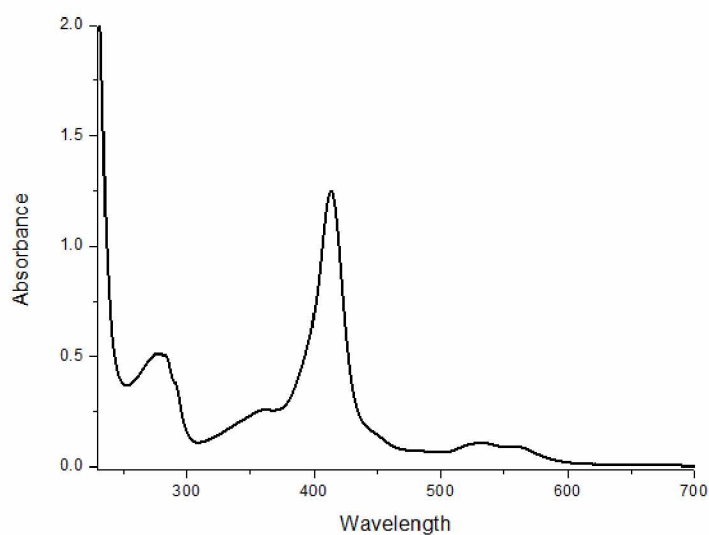
Čistota proteinů byla sledována pomocí SDS-PAGE. Gel nesoucí rozdělené vzorky finálních preparátů ukazuje obrázek 34 na následující straně.



Obr. 34 Elektroforetické rozdělení forem cytochromu b_5

Rozdělení bylo provedeno s využitím 15% gelu. A – přirozená forma; B – mutant E42Q; C – mutant E43Q; D – mutant E42/43Q; E – mutant E48Q; F – mutant E49Q; G – mutant E48/49Q; H – mutant D58N; I – mutant E61Q; J – mutant D65N; K – mutant D71N; M – marker; šipkou je naznačena pozice získaných proteinů

Spektrum jednoho z izolovaných preparátů ukazuje obrázek 35. Jedná se o přirozenou izolovanou formu cytochromu b_5 .



Obr. 35 Absorpční spektrum preparátu přirozené formy cytochromu b_5

Proteinový preparát byl před měřením 50x ředěn.

4.1.6 Popis plasmidu a heterologní exprese CPR

Plasmid obsahující gen potkaní CPR byl získán darem od prof. Graziny Szklarz z Western Virginia University z Morgantown, USA. Tento plasmid, designovaný jako PETOR262, je upravený pET29a a obsahuje tedy T7 promotor. Gen potkaní CPR je upraven a tuto úpravu ukazuje obrázek 36. Úprava provedená původně pro snazší expresi proteinu zahrnovala přidání dodatečné DNA sekvence na začátek samotné sekvence genu. Dodaná část je vodící sekvence *ompA* a linker, přičemž tato část byla původně přidána za účelem vedení proteinu a jeho N-terminální membránové kotvy do vnitřní membrány bakterie a to tak, aby jeho solubilní část přešla do periplasmatického prostoru. Protein bez úpravy byl totiž štěpen bakteriálními proteasami a tato změna měla vyústit v ochranu proteinu. I když k transferu do cytoplasmy nejspíše nedochází a protein je, mimo část své membránovou kotvu, lokalizován na vnitřní straně vnitřní bakteriální membrány, protein je skutečně chráněn proti štěpení. Většina dodatečné části až po linker je po expresi z proteinu odštěpena, a to nejspíše signální proteasou I v periplasmatickém prostoru [129, 154]. Sekvence DNA ověřila přítomnost N-terminální úpravy.

```

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGGA
ATTCCCGGGGATCCGACCAACATGGGGGACTCTCACGAAGACACCAGTGCCACCATGCCTGAGGCC
GTGGCTGAAGAAGTGTCTCTATTTCAGCACGACGGACATGGTTCTGTTTTCTCTCATCGTGGGGGTC
CTGACCTACTGGTTCATCTTTAGAAAGAAGAAAGAAGAGATACCGGAGTTCAGCAAGATCCAAACA
ACGGCCCCACCCGTCAAAGAGAGCAGCTTCGTGGAAAAGATGAAGAAAACGGGAAGGAACATTATC
GTATTCTATGGCTCCCAGACGGGAACCGCTGAGGAGTTTGCCAACCGGCTGTCCAAGGATGCCAC
CGCTACGGGATGCGGGGCATGTCCGCAGACCCTGAAGAGTATGACTTGGCCGACCTGAGCAGCCTG
CCTGAGATCGACAAGTCCCTGGTAGTCTTCTGCATGGCCACATACGGAGAGGGCGACCCACGGAC
AATGCGCAGGACTTCTATGACTGGCTGCAGGAGACTGACGTGGACCTCACTGGGGTCAAGTTTGCT
GTATTTGGTCTTGGGAACAAGACCTATGAGCACTTCAATGCCATGGGCAAGTATGTGGACCAGAGG
CTGGAGCAGCTTGGCGCCAGCGCATCTTTGAGTTGGGCCTTGGTGATGATGACGGGAACCTGGAA
GAGGATTTTCATCACGTGGAGGGAGCAGTTCTGGCCAGCTGTGTGCGAGTTCTTTGGGGTAGAAGCC
ACTGGGGAGGAGTCGAGCATTCGCCAGTATGAGCTCGTGGTCCACGAAGACATGGACGTAGCCAAG
GTGTACACGGGTGAGATGGGCCGTCTGAAGAGCTACGAGAACCAGAAACCCCCCTTCGATGCTAAG
AATCCATTCTGGCTGCTGTCACCGCCAACCGGAAGCTGAACCAAGGCACTGAGCGGCATCTAATG
CACCTGGAGTTGGACATCTCAGACTCCAAGATCAGGTATGAATCTGGAGATCACGTGGCTGTGTAC
CCAGCCAATGACTCAGCCCTGGTCAACCAGATTGGGGAGATCCTGGGAGCTGACCTGGATGTCATC
ATGTCTCTAAACAATCTCGATGAGGAGTCAAACAAGAAGCATCCGTTCCCCTGCCCCACCACCTAC
CGCACGGCCCTCACCTACTACCTGGACATCACTAACCCGCCACGCACCAATGTGCTCTACGAACCTG
GCACAGTACGCCTCAGAGCCCTCGGAGCAGGAGCACCTGCACAAGATGGCGTCATCCTCAGGCGAG
GGCAAGGAGCTGTACCTGAGCTGGGTGGTGAAGCCCGGAGGCACATCCTAGCCATCCTCCAAGAC
TACCCATCACTGCGGCCACCCATCGACCACCTGTGTGAGCTGCTGCCACGCCTGCAGGCCCGATAC
TACTCCATTGCCTCATCCTCCAAGGTCCACCCCAACTCCGTGCACATCTGTGCCGTGGCCGTGGAG
TACGAAGCGAAGTCTGGCCGAGTGAACAAGGGGTGGCCACTAGCTGGCTTCGGGCCAAGGAACCA
GCAGGCGAGAATGGCGGCCGCGCCCTGGTACCCATGTTTCGTGCGCAAATCTCAGTTCCGCTTGCCT
TTCAAGTCCACCACACCTGTCATCATGGTGGGCCCGGCACTGGGATTGCCCTTTTCATGGGCTTC
ATCCAGGAACGAGCTTGGCTTCGAGAGCAAGGCAAGGAGGTGGGAGAGACGCTGCTATACTATGGC

```

TGCCGGCGCTCGGATGAGGACTATCTGTACCGTGAAGAGCTAGCCCGCTTCCACAAGGACGGTGCC
 CTCACGCAGCTTAATGTGGCCTTTTCCCGGGAGCAGGCCCAAGGTCTATGTCCAGCACCTTCTG
 AAGAGAGACAGGGAACACCTGTGGAAGCTGATCCACGAGGGCGGTGCCACATCTATGTGTGCGGG
 GATGCTCGAAATATGGCCAAAGATGTGCAAACACATTCTATGACATTGTGGCTGAGTTCGGGCCC
 ATGGAGCACACCCAGGCTGTGGACTATGTTAAGAAGCTGATGACCAAGGGCCGCTACTACTAGAT
 GTGTGGAGCTAG

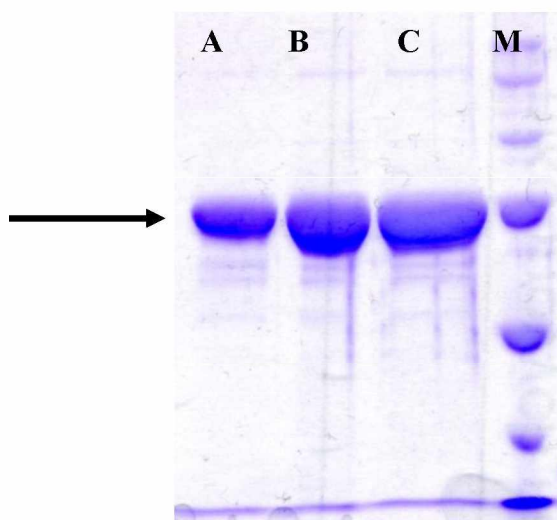
MKKTATATAVALAGFATVAQAAGIPGDPTNMGDSHEDTSATMPEAVAEVSLFSTTDMVLFSLIVGV
 LTYWFI FRKKKEEIP EFSKIQT TAPPVKES SFVEKM KKTGRNI I VFYGSQTGTAE EFANRLSKDAH
 RYGMRGMSADPEEYDLADLSSLPEIDKSLVFCMATYGEEDPTDNAQDFYDWLQETD DVLDTGVKFA
 VFGLGNKTYEHFNAMGKYVDQRLEQLGAQRIFELGLGDDDNLEEDFITWREQFWPAVCEFFGVEA
 TGEESSIRQYELVVHEDMDVAKVYTGEMGR LKSYENQKPPFDAKNPFLAAVTANRKL NQGTERHLM
 HLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNQIG EILGADLDVIMSLNNLDEESNKKHPFPCPTY
 RTALTYLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEQEHLHKMASSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQD
 YPSLRPPIDHLCCELLPRLQARYYSIASSSKVHPNSVHICAVAVEYEAKSGRVNKG VATSWLRAKEP
 AGENGGRALVPMFVRKSQFRLPFKSTTPVIMVGP GTGIAPFMGFIQERAWLREQGKEVGETLLYYG
 CRRSDEDYLYREELARFHKDGALTQLNVAFSREQAHKVYVQHLLKRDREHLWKLIHEGGAHIYVCG
 DARNMAKDVQNTFYDIVAEFGPMEHTQAVDYVKKLMTKGRYSLDVWS-

Obr. 36 Sekvence části DNA a proteinu CPR

Dodaná ompA vodící sekvence je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, linker mezi sekvencí genu a ompA sekvence je zobrazen fialově; stop kodony jsou zobrazeny červeným zbarvením. Mezi zelenou a fialovou částí dochází při expresi ke štěpení proteinu.

Dle informací prof. Szklarz nelze protein exprimovat v bakteriích pocházejících od kmene B a proto byl k expresi použit kmen bakterií *Escherichia coli* JM109 (DE3). Tento kmen je odvozen z kmene K-12 a je schopen exprimovat geny nacházející se pod kontrolou T7 promotoru. Byly provedeny také pokusy s úpravou plasmidu vyštěpením potkaní formy a vložením a následnou expresí lidské formy CPR. Tyto pokusy ale nevedly k úspěchu, neboť lidská CPR byla štěpena bakteriálními proteasami na více místech naráz. Původní postup exprese potkaní formy počítající s méně výživným médiem a nižší koncentrací induktoru byl upraven, stejně jako izolační postup, dle [130]. Použitý postup byl tedy kombinací postupu původního a výše citovaného. Zmíněnou kombinací došlo hlavně k odstranění detergentu Triton X-100. Původní postup laboratoře z USA počítal se zachováním malé koncentrace tohoto detergentu (0,1%), ale jeho přítomnost v inkubační směsi může vést k výraznému ovlivnění reakce cytochromu P450 [155].

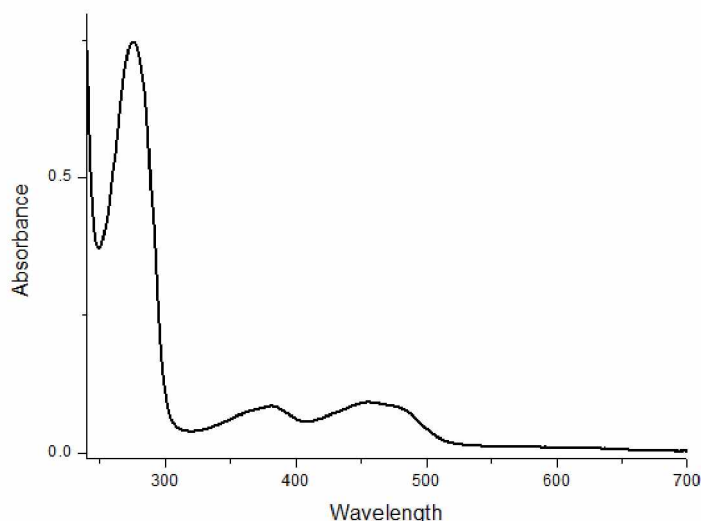
K provedení metabolických pokusů byl vybrán preparát s koncentrací 42 μM , jehož se ze 4 litrů expresního média podařilo izolovat 378 nmol. Výtěžek tedy odpovídal 94,5 nmol na jeden litr expresního média. Jeho rozdělení na SDS-PAGE ukazuje obrázek 37 na následující straně.



Obr. 37 Elektroforetické rozdělení preparátu CPR

Rozdělení bylo provedeno s využitím 8% gelu. A – 100 pmol; B – 200 pmol; C – 200 pmol; M – marker; šipkou je naznačena pozice získaného proteinu.

Bylo také měřeno absorpční spektrum izolované CPR, které ukazuje obrázek 38.



Obr. 38 Absorpční spektrum preparátu CPR

Proteinový preparát byl před měřením 10x ředěn.

Výsledky z heterologní exprese a izolace CPR a jejího použití v experimentech jsou součástí publikace, která je přílohou č. 3 disertační práce [144].

4.1.7 Příprava plasmidu a heterologní exprese CYB5R3

Gen CYB5R3 byl získán z databáze DNASU (klon HSCD00073999) na klonovacím vektoru. Následně byl gen podroben úpravě pomocí PCR a vložen do pET-28a. Na sekvenci výsledného proteinu se úprava projevuje odebráním N-terminální

membránové kotvy. Celkem bylo odebráno prvních 23 aminokyselin proteinu. Následně byla klonováním do plasmidu pET-28a do sekvence finálního proteinu vložena histidinová kotva ze šesti histidinů, která je od sekvence samotného proteinu oddělena linkerem obsahujícím štěpící místo pro proteasu thrombin. Sekvenci DNA genu klonovaného v plasmidu a sekvenci proteinu ukazuje obrázek 39.

```
ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCATCAC AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAG
CTGTTCCAGCGCTCCACGCCAGCCATCACCTCGAGAGCCCGGACATCAAGTACCCGCTGCGGCTC
ATCGACCGGGAGATCATCAGCCATGACACCCGGCGCTTCCGCTTTGCCCTGCCGTACCCCCAGCAC
ATCCTGGGCCTCCCTGTCGGCCAGCACATCTACCTCTCGGCTCGAATTGATGGAAACCTGGTCGTC
CGGCCCTATACCCCATCTCCAGCGATGATGACAAGGGCTTCGTGGACCTGGTCATCAAGGTTTAC
TTCAAGGACACCCATCCCAAGTTTCCCGCTGGAGGGAAGATGTCTCAGTACCTGGAGAGCATGCAG
ATTGGAGACACCATTGAGTTCCGGGGCCCCAGTGGGCTGCTGGTCTACCAGGGCAAAGGGAAGTTC
GCCATCCGACCTGACAAAAAGTCCAACCCTATCATCAGGACAGTGAAGTCTGTGGGCATGATCGCG
GGAGGGACAGGCATACCCCCGATGCTGCAGGTGATCCGCGCCATCATGAAGGACCTGATGACCAC
ACTGTGTGCCACCTGCTCTTTGCCAACCAGACCGAGAAGGACATCCTGCTGCGACCTGAGCTGGAG
GAACTCAGGAACAAACATTCTGCACGCTTCAAGCTCTGGTACACGCTGGACAGAGCCCCCTGAAGCC
TGGGACTACGGCCAGGGCTTCGTGAATGAGGAGATGATCCGGGACCACCTTCCACCCCCAGAGGAG
GAGCCGCTGGTGCTGATGTGTGGCCCCCACCCATGATCCAGTACGCCTGCCTTCCCAACCTGGAC
CACGTGGGCCACCCACGGAGCGCTGCTTCGTCTTCTAA
```

```
MGSS HHHHHHSSGLVPR*GSHMKLFQRSTPAITLESPIKYPLRLIDREIIISHDTRRRFRFALPSPQ
HILGLPVGQHIYLSARIDGNLVVRPYTPISSDDDKGFVDLVIKVYFKDTHPKFPAGGKMSQYLESM
QIGDTIEFRGPSGLLVYQGKGKFAIRPDKKSNIIRTVKSVGMIAGGTGITPMLQVIRAIMKDPDD
HTVCHLLFANQTEKDILLRPELEELRNKHSARFKLWYTLDRAPAWDYQGQGVNEEMIRDHLPPPE
EEPLVLMCGPPPMIQYACLPNLDHVGHPTERCVF-
```

Obr. 39 Sekvence části DNA a proteinu CYB5R3

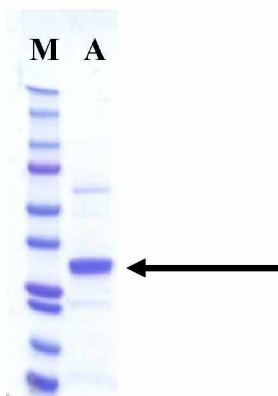
Dodaná histidinová kotva vodící sekvence je v sekvencích zobrazena zeleným podbarvením, štěpící místo thrombinu je zobrazeno žlutě podbarvenou hvězdičkou, sekvence pocházející z proteinové sekvence je zobrazena tučným písmem, červeně je zobrazen stop kodon.

Sekvence nesoucí histidinovou kotvu může být odštěpena. Provedená úprava je podobná již publikované úpravě, kde byla histidinová kotva vázána na delším proteinovém linkeru. Tento linker byl v původní práci odštěpován, ale štěpící proteasu nebylo možné z preparátu zcela odstranit. Navíc bylo zjištěno, že aktivita proteinu s histidinovou kotvou a větším linkerem je shodná jako aktivita proteinu bez histidinové kotvy [156]. Proto nebylo přistoupeno ke štěpení histidinové kotvy a protein byl k experimentům použit s celou přidanou sekvencí linkeru a histidinové kotvy.

Protein byl exprimován v kmeni C41 (DE3), který disponuje jednou nebo více neznámými mutacemi a byl použit k expresi některých membránových proteinů [157].

Protein při finálním koncentrování precipitoval a proto byl druhý izolovaný a následně použitý preparát uchován v pufru s vyšší iontovou silou.

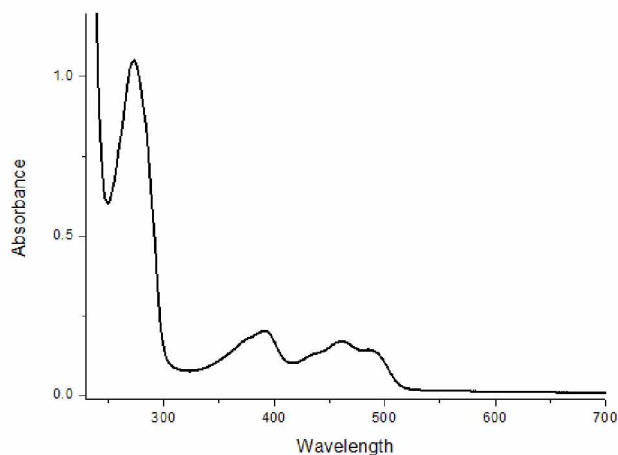
K provedení metabolických pokusů byl vybrán preparát s koncentrací 153 μM , jehož se ze 4 litrů expresního média podařilo izolovat 1530 nmol. Výtěžek tedy odpovídal přibližně 383 nmol na jeden litr expresního média. Jeho rozdělení na SDS-PAGE ukazuje obrázek 40.



Obr. 40 Elektroforetické rozdělení preparátu CYB5R3

Rozdělení bylo provedeno s využitím 12% gelu. A – vzorek 50 pmol; M – marker; šipkou je naznačena pozice získaného proteinu.

Bylo také měřeno absorpční spektrum izolované CYB5R3, které ukazuje obrázek 41. Z obrázku je patrné, že připravený protein obsahuje flavinový kofaktor nezbytný pro svou enzymovou aktivitu.



Obr. 41 Absorpční spektrum preparátu CYB5R3

Proteinový preparát byl před měřením 10x ředěn.

4.2 REDUKCE SAVČÍCH CYTOCHROMŮ P450 V INTAKTNÍCH BAKTERIÁLNÍCH BUŇKÁCH A POTENCIÁLNÍ ROLE FLAVODOXINU

Impulzem k provedení těchto experimentů byl nález vysoké množství redukováných forem u některých cytochromů P450 přímo v intaktních buňkách bakterie *Escherichia coli*. Jelikož bylo známo, že CYP1A2 může být redukován flavodoxinem stejně jako CYP17A1, byl flavodoxin vzat v potaz jako hlavní možný uměle vytvořený redukční partner. Samotný flavodoxin je v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* redukován NADH:flavodoxin reduktasou [18, 19]. K pokusům byly využity také cytochromy P450 stojící mimo rodinu CYP1, pro které byly v laboratoři k dispozici vhodné expresní vektory a u kterých byly zároveň známy prostorové koordináty.

Se všemi zvolenými cytochromy P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 a CYP2C8) byla provedena exprese u každé po třech lahvích v 25 ml média. Každá láhev s médiem byla inokulována stejným množstvím společné výchozí kultury. Po 48 hodinách od počátku produkce byly z produkčních lahví odebrány vzorky k měření koncentrace cytochromu P450 a cytochromu P420. Měření bylo provedeno jak bez přidání externího redukčního činidla ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) tak i v jeho přítomnosti. V prvním případě byl detekován pouze enzym přirozeně redukováný v bakteriálním prostředí v druhém pak celkový cytochrom P450.

Výsledkem byl přehled koncentrací redukováných cytochromů P450 a jejich neaktivních forem P420 v bakteriálních buňkách v porovnání s jejich celkovým obsahem (tabulka 23). Hodnota označující koncentraci denaturované formy P420 ve skutečnosti může být poněkud nižší, protože k ní také přispívají bakteriální hemoproteiny.

Tab. 23 Koncentrace exprimovaných cytochromů P450

Protein	(- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) c (P450) nmol/ml	(- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) „c (P420)“ nmol/ml	(+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) c (P450) nmol/ml	(+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) „c (P420)“ nmol/ml
CYP1A1	216,5	345,0	164,8	432,5
	234,1	414,4	160,4	421,6
	198,9	501,8	130,8	335,1
CYP1A2	523,1	55,9	734,1	114,4

	520,9	163,1	658,3	ND
	493,4	63,9	685,7	ND
CYP2B6	152,7	326,1	153,8	215,3
	109,9	547,7	68,1	315,3
	189,0	397,3	131,9	198,2
CYP2D6	29,5	214,4	36,3	283,8
	56,0	372,1	33,0	372,0
	63,7	262,2	31,9	373,9
CYP2C8	550,3	852,3	1273,6	162,2
	490,1	1250,5	1547,3	ND
	246,2	121,6	1062,6	ND

Je nutno poznamenat, že hodnota označující koncentraci „denaturované formy“ vychází také z dat pro celé bakteriální buňky a tak je do absorpance a tím i do výpočtu koncentrace zahrnuta nespecifikovaná chyba. Ta vychází z faktu, že při tomto měření bakteriální hemoproteiny vykazují maximum při nebo v okolí 420 nm. Přesto byla tato informace zachycena z důvodu sledování vlivu přidání dithioničitanu do stejné kultury. Průměrované výsledky s odchylkami ukazuje tabulka 24.

Tab. 24 Koncentrace exprimovaných cytochromů P450 a statistické zpracování

Protein	(- Na ₂ S ₂ O ₄) c (P450) nmol/ml	(- Na ₂ S ₂ O ₄) „c (P420)“ nmol/ml	(+ Na ₂ S ₂ O ₄) c (P450) nmol/ml	(+ Na ₂ S ₂ O ₄) „c (P420)“ nmol/ml
CYP1A1	216,5 ± 14,4	420,4 ± 64,1	152,0 ± 15,1	396,4 ± 43,5
CYP1A2	512 ± 13,5	94,3 ± 48,7	692,7 ± 31,3	38,1 ± 53,9
CYP2B6	150,5 ± 32,3	423,7 ± 92,4	118,0 ± 36,4	242,9 ± 51,6
CYP2D6	49,5 ± 15,1	282,9 ± 66,0	33,7 ± 1,8	343,2 ± 42,1
CYP2C8	428,9 ± 131,6	408,1 ± 318,4	1294,5 ± 242,3	54,1 ± 93,6

Do výsledků byla zahrnuta i data z [158] a následně byla data zpracována pro posouzení obsahu správně sbalené formy CYP (tabulka 25 na následující straně). Většina studovaných proteinů se v bakteriích vyskytovala v redukované formě, pouze CYP2C8 byl nalezen ve formě oxidované. Některé proteiny vykazovaly vyšší koncentraci správně složené formy bez přítomnosti dithioničitanu sodného (např. CYP1A1), což může být

způsobeno poškozením proteinu při dodání dithioničitanu a tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů. To může poukazovat na nestabilitu těchto proteinů v prostředí bakteriální buňky.

Tab. 25 Procentuální zastoupení redukovaného CYP exprimovaných v bakteriálních buňkách

Lidský CYP	Procentuální průměr množství redukovaného CYP v bakteriích	Relativní zastoupení cytochromu P450 (% = $P450 / (P450 + P420) * 100$)	
		- $Na_2S_2O_4$	+ $Na_2S_2O_4$
CYP1A1	143 ± 20	34 ± 2	28 ± 1
CYP1A2	86 ± 11 ^a ; 74 ± 4	85 ± 8	96 ± 8
CYP2A6	92 ± 20 ^a	-	-
CYP2A13	104 ± 4 ^a	-	-
CYP2B6	135 ± 32	27 ± 10	33 ± 13
CYP2C8	34 ± 13	80 ± 30	94 ± 10
CYP2C9	33 ± 9 ^a	-	-
CYP2D6	150 ± 63	15 ± 4	9 ± 2
CYP3A4	18 ± 10 ^a	-	-

^a Data převzata z [158]

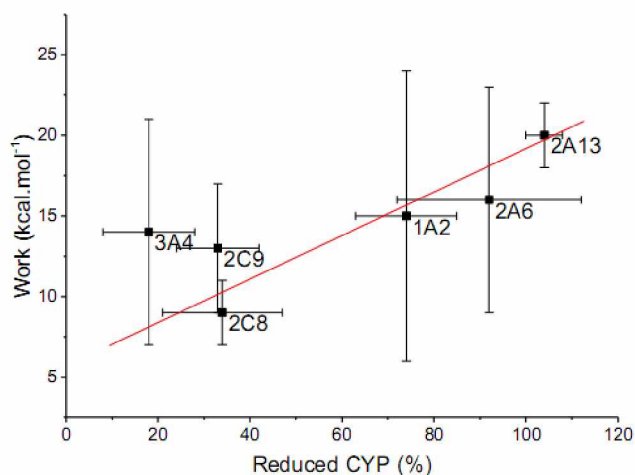
Jak je patrné z tabulky 25, zástupci podrodin CYP1A, 2A, 2B a 2D jsou v bakteriálním systému prakticky kompletně redukovány, zatímco zástupci podrodin CYP2C a 3A jsou redukovány jen zanedbatelně.

Pro vysvětlení výše uvedeného zjištění o různé míře redukce pozorované u jednotlivých skupin cytochromů P450, byly Mgr. Martinem Culkou provedeny predikce afinity zmíněných cytochromů P450 k flavodoxinu pomocí molekulárního modelování. K tomu byl využit flexibilní protein-protein docking, molekulová dynamika a „steered“ molekulová dynamika. Pomocí nich byla předpovězena práce potřebná pro disociaci jednotlivých komplexů a také vzdálenost redoxních center interagujících proteinů. Oba tyto parametry by měly vypovídat o rychlosti, jakou může bakteriální flavodoxin jednotlivé cytochromy redukovat (tabulka 26 na následující straně).

Tab. 26 Procentuální zastoupení redukováného CYP exprimovaných v bakteriálních buňkách. Data disociační práce jsou průměry ze tří kalkulačí; data vzdáleností jsou průměry ze 2 posledních nanosekund simulace

Komplex CYP-flavodoxin	Disociační práce [kcal.mol ⁻¹]	Vzdálenost redoxních center [Å]
CYP1A2	15 ± 9	10,5 ± 0,3
CYP2A6	16 ± 7	11,2 ± 0,5
CYP2A13	20 ± 2	9,8 ± 0,5
CYP2C8	9 ± 2	13,4 ± 0,5
CYP2C9	13 ± 4	12,5 ± 0,5
CYP3A4	14 ± 7	15,8 ± 0,6

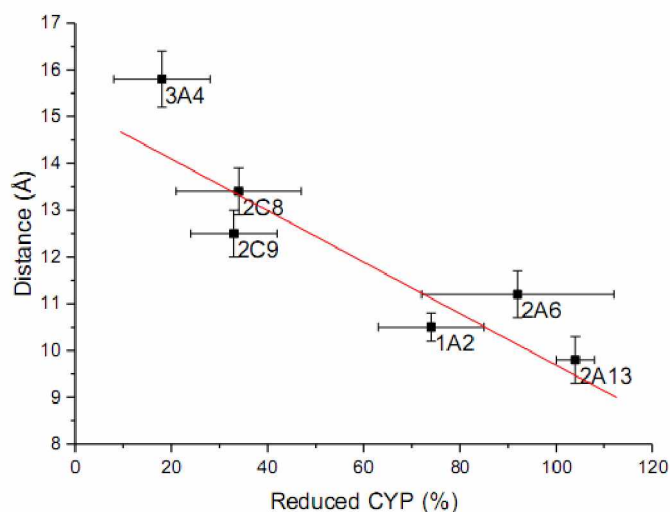
Dále byl sledován vztah mezi stupněm redukce jednotlivých cytochromů P450 a jejich předpovězenou interakcí s flavodoxinem. Konkrétně byl ověřován vztah procentuálního množství redukováného CYP s prací nutnou pro disociaci jeho komplexu s flavodoxinem. Přestože zjištěný vztah vychází statisticky jako signifikantní, Pearsonův korelační koeficient $r = 0.94$ a $p = 0.005$ (obrázek 42). Kvůli velkému rozptylu hodnot disociace většiny komplexů jej nepovažujeme za příliš signifikantní.



Obr. 42 Korelační analýza vztahu mezi zastoupením redukováných CYP v bakterii a prací nutnou k disociaci komplexů CYP-flavodoxin.

Lepší situace je v případě další korelace poukazující na vztah mezi stupněm redukce jednotlivých cytochromů P450 a vzdálenosti redoxních center obou proteinů tvořících komplex. Ta poukazuje na blízkost redoxních center u těch proteinů, které jsou dosti redukovány v bakteriálním systému. Pearsonův korelační koeficient může i v tomto

případě být označen za signifikantní, $r = 0.89$ a $p = 0.02$. Výhodou zde jsou mnohem nižší chyby predikce vzdáleností proteinových partnerů. Vzdálenost 14 Å je považována za kritickou pro efektivní přenos elektronů v živých systémech [159]. Zajímavé je, že velmi málo redukované enzymy CYP2C8, 2C9 a 3A4 se této hranici blíží nebo jí v posledním případě i překračují (obrázek 43).



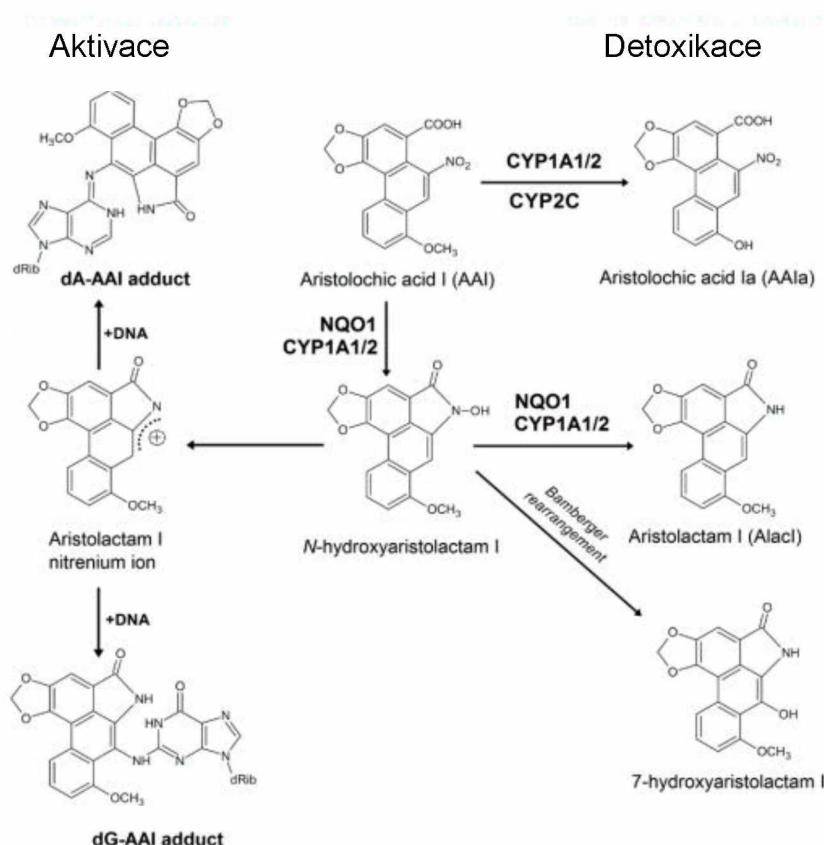
Obr. 43 Korelační analýza vztahu mezi zastoupením redukovaných CYP v bakterii a vzdáleností redoxních center v modelech komplexů CYP-flavodoxin.

Tyto výsledky naznačují, že bakteriální flavodoxin může být zodpovědný za redukci některých lidských cytochromů P450 exprimovaných v bakteriálních buňkách.

Výsledky z této části práce jsou součástí publikace, která je přílohou č. 2 disertační práce [160].

4.3 STUDIUM VLIVU MUTACE POLÁRNÍHO REZIDUA V AKTIVNÍM MÍSTĚ CYP1A1, CYP1A2 A CYP1B1 NA JEJICH ENZYMOVOU AKTIVITU

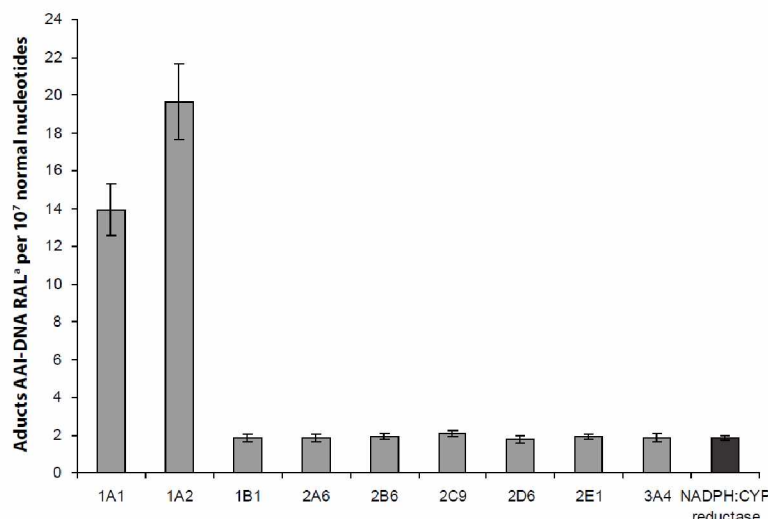
Tato část práce se zabývala vlivem záměny jedné z aminokyselin nacházející se v aktivním centru studovaných cytochromů P450 na schopnost přeměny aristolochové kyseliny I (AAI). Tato látka je v těle metabolizována buď redukční aktivací, nebo oxidačně detoxikační cestou, což ukazuje obrázek 44 na následující straně. Látka může být oxidována enzymy na aristolochovou kyselinu Ia, v případě redukce je látka metabolizována na N-hydroxyaristolaktam I tvořící následně nitreniový ion schopný tvořit adukty s DNA [161].



Obr. 44 Mechanismus metabolismu aristolochové kyseliny

Převzato z [161].

Dříve provedené teoretické výpočty využívající molekulární modelování poukázaly na možnou důležitost přítomnosti hydroxylových skupin v aktivním centru enzymů. Tyto skupiny v postranních řetězcích reziduí Ser122 a Thr124 se v proteinech CYP1A1 a CYP1A2 nacházejí v těsné blízkosti nitroskupiny vázané molekuly aristolochové kyseliny. To umožňuje předat substrátu v rámci redukce potřebný proton. Teoretická práce zahrnovala i výpočty a interakce i se třetím členem rodiny CYP1, proteinem CYP1B1. Ten na podobné pozici v aktivním centru nemá hydroxylovou skupinu, neboť v daném místě je přítomen alanin a ani v okolí se jiná hydroxylová skupina nenachází. CYP1B1 přitom vykazuje mnohem nižší aktivitu v redukci AAI než CYP1A1 a CYP1A2 (obrázek 45, následující strana).

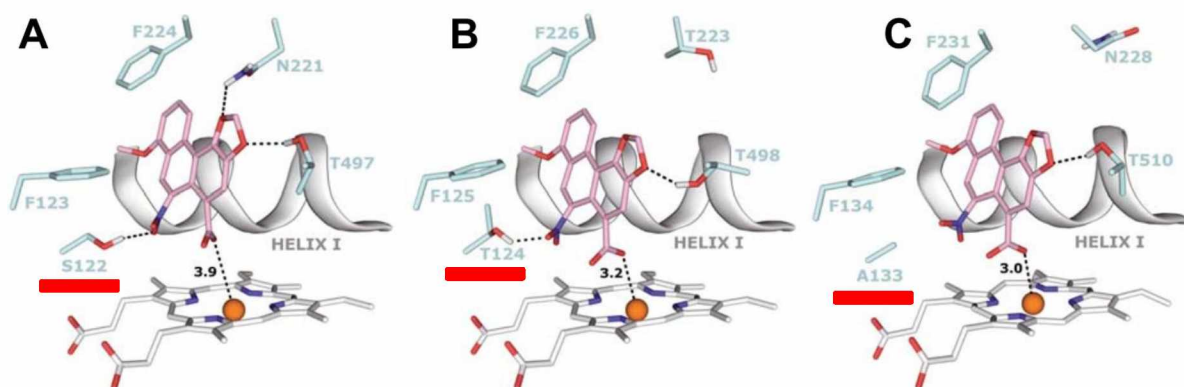


Obr. 45 Kvantifikace aduktů v DNA vzniklých z redukčních metabolitů aristolochové kyseliny I aktivací exprimovanými CYP v SupersomechTM
Převzato ze [162].

Byla tedy vyslovena hypotéza, že příčina menší aktivity CYP1B1 v redukci aristolochové kyseliny I na N-hydroxyaristolactam I by mohla být právě absence vhodného donoru protonu [67].

Proto byly čisté rekombinantní proteiny CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a jejich mutanti (S122A, T124V a A133S) odstraňující anebo naopak zavádějící hydroxyskupinu na totéž místo ve vazebné kavitě proteinu. Ty pak byly použity k praktickému ověření teoretických výsledků předchozí práce.

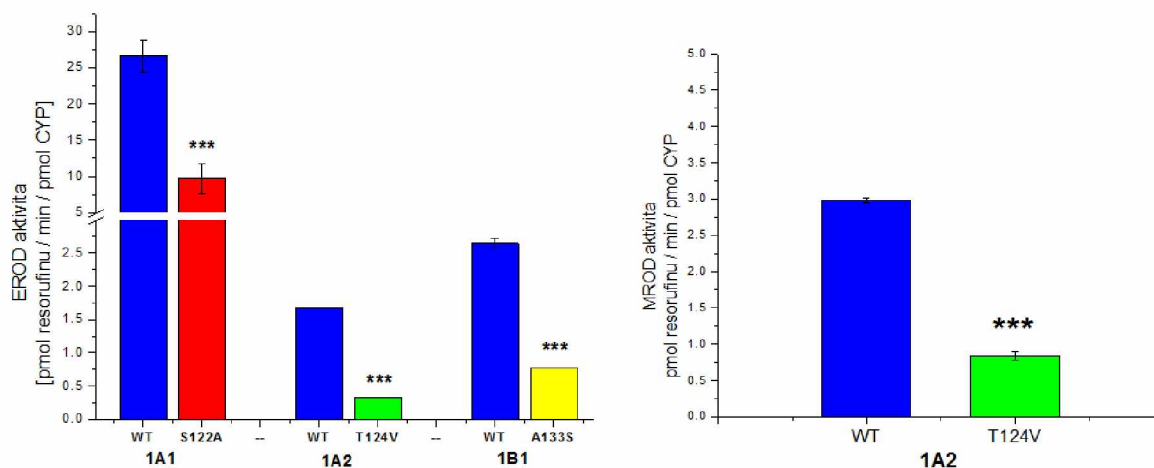
Mutace proteinů byly zvoleny ve snaze získat na příslušných pozicích podobná strukturní rezidua, co nejpodobnější velikostí původní aminokyselině tak, aby došlo jen k minimálnímu narušení tvaru kavity. Proto nebyla provedena mutace všech zmíněných pozic na často používaný glycin, ale na jiné aminokyseliny. V případě CYP1A1 byl serin zaměněn za alanin, v CYP1A2 byl threonin zaměněn za valin a v CYP1B1 byl alanin vyměněn za serin. To vedlo buď k odstranění, nebo přidání hydroxylové skupiny do aktivního centra. V případě threoninu v CYP1A2 nebylo možné najít aminokyselinu představující „threonin bez hydroxyly“, proto nebyl hydroxyl pouze odstraněn, ale byl nahrazen methylovou skupinou obsaženou ve valinu. Tyto změny ukazuje obrázek 46 na následující straně, srovnávající modely interakce AAI s aktivním centrem testovaných proteinů.



Obr. 46 Srovnání aktivních center CYP1A1 (A), CYP1A2 (B) a CYP1B1 (C) vázajících aristolochovou kyselinu I.

Černě tečkované linie představují vodíkové můstky, oranžová koule představuje ion železa. Převzato z [67].

Proteiny byly rekonstituovány v systému liposomů v přítomnosti potkaní CPR. Aktivita získaných proteinů byla nejprve ověřena reakcí s 7-ethoxyresorufinem, který je označován za markerový substrát rodiny cytochromů P450 rodiny 1. Jak je patrné z obrázku 47, aktivita mutantních forem byla oproti přirozeným formám 2x - 4x nižší. Stejně tak byla pozorována nižší aktivita CYP1A2 oproti ostatním členům rodiny, který lépe metabolizuje O-demethylaci 7-methoxyresorufinu. I v tomto případě ale byla aktivita CYP1A2 mutantu T124V snižena. Je tedy možné, že mutace rezidua v aktivním centru vedla ke změně struktury nebo stability aktivního místa, a tím ke změně síly interakce derivátů resorufinu s exprimovanými proteiny. Pokles enzymové aktivity mutantů naštěstí nebyl tak silný, aby znemožnil stanovení jejich aktivity vůči AAI.

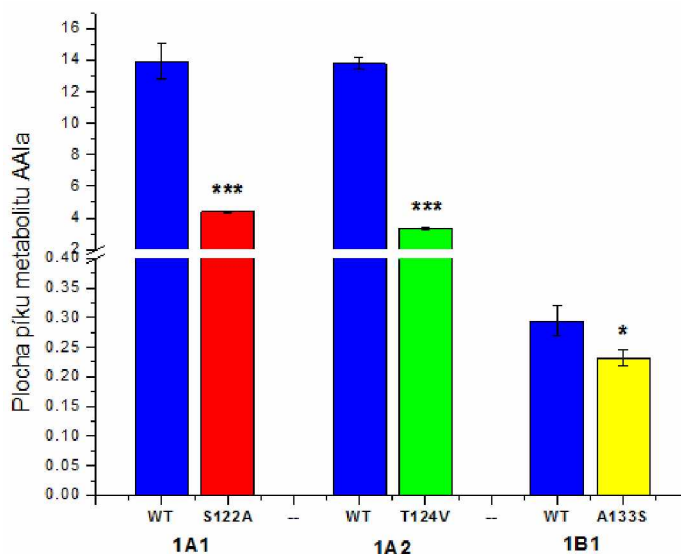


Obr. 47 Aktivita exprimovaných cytochromů P450 vůči 7-ethoxyresorufinu (EROD) a 7-methoxyresorufinu (MROD)

Modře jsou zobrazeny přirozené formy proteinů, odlišnými varvami jsou zobrazeny mutantní proteiny. Signifikance vzorků je stanovena proti vzorku obsahující stejný CYP bez obsahu cyt b₅.

Získané proteiny byly, opět ve spojení s potkaní CPR, využity pro zjištění vlivu popsaných mutací na aktivitu ve směru oxidace aristolochové kyseliny I, tedy na přeměnu substrátu detoxikační cestou. Jak lze pozorovat na obrázku 48 ukazujícím výsledky této přeměny aktivita mutantů CYP1A1 a CYP1A2 byla vůči oxidaci AAI snížena cca 3,5x a aktivita CYP1B1 vůči oxidaci AAI byla mutací postižena jen minimálně.

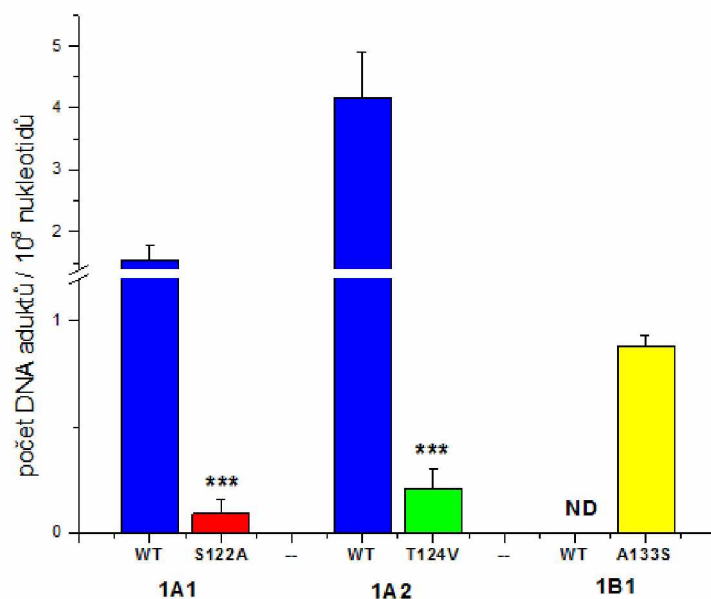
Je tedy možné, že serin nahrazující alanin stabilizuje aristolochovou kyselinu v aktivním centru a může tedy kompenzovat obecnou ztrátu aktivity mutantu.



Obr. 48 Oxidace aristolochové kyseliny I provedená exprimovanými cytochromy P450

Modře jsou zobrazeny přirozené formy proteinů, odlišnými varvami jsou zobrazeny mutantní proteiny. Signifikance vzorků je stanovena proti vzorku obsahující stejný CYP bez obsahu cyt b₅.

Nakonec byla stanovena i redukční přeměna aristolochové kyseliny pomocí metody ³²P-postlabelingu a s kvantifikací aduktů s DNA (obrázek 49, následující strana).



Obr. 49 Kvantifikace aduktů DNA vzniklých z redukčních metabolitů aristolochové kyseliny I aktivací exprimovanými CYP v rekonstituovaných systémech

ND představuje nedetekovatelné množství aduktů; výsledky jsou vztaženy na aktivitu samotné CPR. Signifikance vzorků je stanovena proti vzorku obsahující stejný CYP bez obsahu cyt b₅.

Aktivita mutantů CYP1A1 a CYP1A2 byla významně snížena oproti aktivitě jejich přirozených forem. Oproti tomu, zavedení hydroxylové skupiny do přirozené formy CYP1B1 zvýšila tvorbu aduktů na hodnoty téměř srovnatelné s aktivitou přirozené formy CYP1A1.

Nepřítomnost hydroxylové skupiny u mutantů S122A a T124V proteinů CYP1A1 a CYP1A2 vedou ke snížené schopnosti redukce nitroskupiny aristolochové kyseliny I, a tím ke snížené tvorbě aduktů s DNA. Naproti tomu, mutant A133S proteinu CYP1B1 obsahující serin v této přeměně vykazuje zvýšenou aktivitu. Ukázalo se tedy, že přítomnost vhodně umístěné hydroxylové skupiny je důležitá pro nitroreduktasovou aktivitu rodiny CYP 1 vůči AAI.

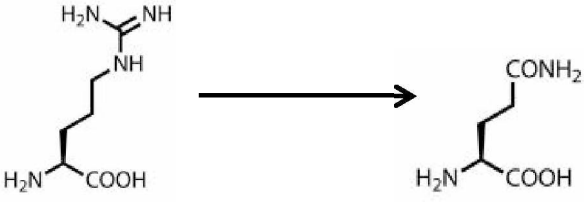
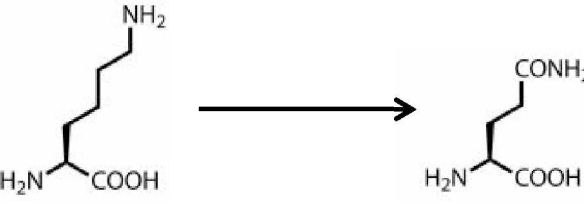
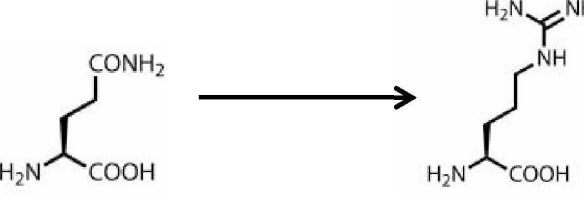
Výsledky z této části práce jsou uvedeny v publikaci, která tvoří přílohu č. 3 disertační práce [144].

4.4 STUDIUM AKTIVITY LIDSKÝCH REKOMBINANTNÍCH CYTOCHROMŮ P450 V REKONSTITUOVANÝCH SYSTÉMECH

Pro realizaci této části práce byla exprimována a purifikována řada proteinů a jejich mutantů.

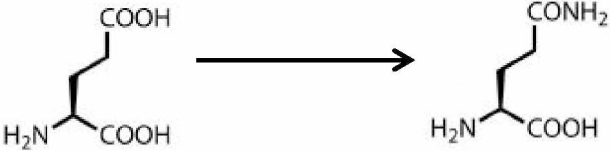
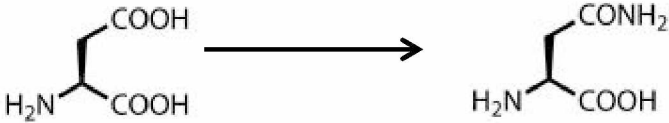
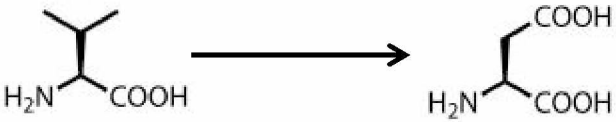
V mutantech CYP1A1 a CYP1A2 byly zaměněny různé pozice aminokyselin tak, aby došlo k záměně bazické aminokyseliny za neutrální či naopak. Změny provedené v mutantech ukazuje tabulka 27.

Tab. 27 Změny aminokyselin na mutantech CYP1A1 a CYP1A2

Změna	Změna vyjádřená chemickými vzorci	Pozice na CYP1A1	Pozice na CYP1A2
R → Q		135	137 296
K → Q		454	455
Q → R		139 293	141

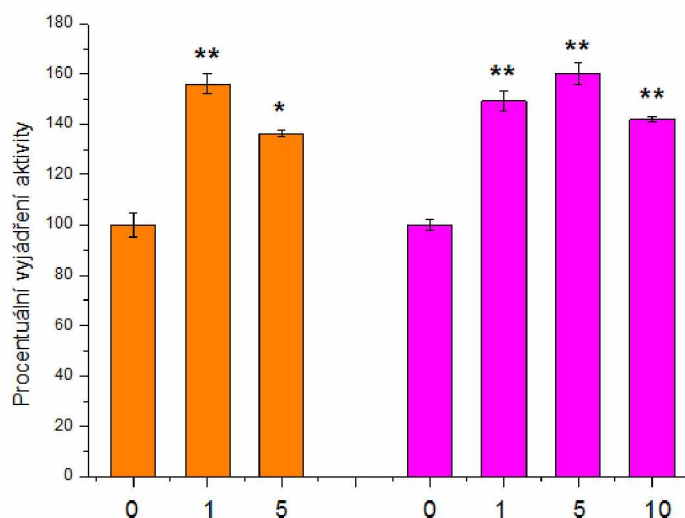
V mutantech cyt b₅ byly zaměněny různé pozice aminokyselin tak, aby naopak došlo k záměně kyselé aminokyseliny za neutrální. Výjimkou byla změna jedné neutrální za kyselou. Změny provedené v mutantech ukazuje tabulka 28.

Tab. 28. Změny aminokyselin na mutantech CYP1A1 a CYP1A2

Změna	Změna vyjádřená chemickými vzorci	Pozice na cyt b ₅
E → Q		42 43 42,43 49 48 49,49 61
D → N		58 65 71
V → D		141

4.4.1 Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅

V rámci metabolických pokusů byl zjišťován modulační vliv membránové formy lidského cytochromu b₅ na aktivitu cytochromů P450. K tomu bylo vybráno několik látek, které jsou známé jako markerové substráty těchto enzymů. Pro CYP1A1 bylo vybráno azobarvivo Sudan I (markerový substrát CYP1A1) [28, 29] a léčivo fenacetin. Výsledné ovlivnění aktivity CYP1A1 ukazuje obrázek 50 na následující straně.



Obr. 50 Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A1 přítomností přirozené formy cytochromu b₅

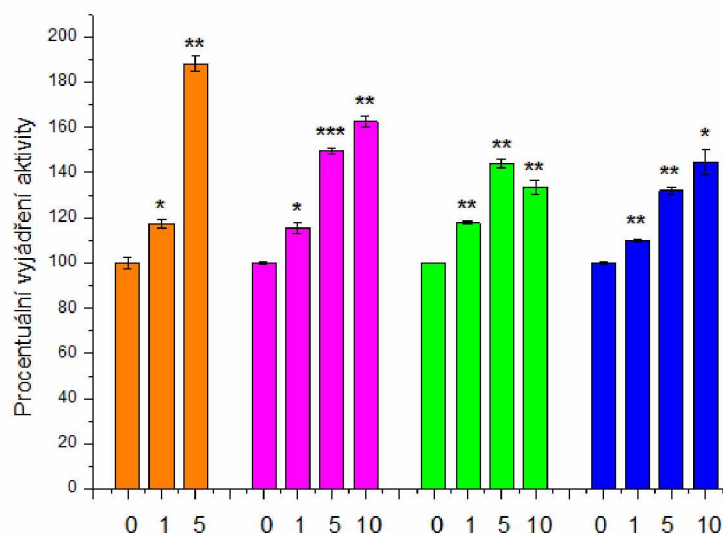
Oranžové sloupce – aktivita vůči Sudanu I; fialové sloupce – aktivita vůči fenacetinu. Molární poměr cyt b₅ vůči CYP1A1 byl různý, což je naznačeno násobkem množství cyt b₅ na popiscích horizontální osy.

Aktivita CYP1A1 byla zvýšena přidavkem cyt b₅ jak v případě přeměny Sudanu I, tak fenacetinu. V oxidaci Sudanu I došlo k nejvyššímu zvýšení při dodání stejného molárního množství cyt b₅, zatímco v pětinasobném poměru bylo zvýšení aktivity méně zřetelné.

Oxidace fenacetinu byla cytochromem b₅ rovněž zvýšena, a to ve všech studovaných molárních poměrech cyt b₅ vůči CYP1A1.

Zvolené molární poměry cyt b₅ vůči formám CYP byly navrženy z hlediska studování protein-proteinových interakcí a také dle studie modelů těchto enzymů, kdy byla interakce modelována v ekvimolárním poměru obou proteinů [67]. Vyšší molární poměry byly voleny z důvodu sledování možného zvýšení vlivu nebo případné saturace vlivu. Z výsledků je patrné, že aktivita CYP1A1 byla v přítomnosti cyt b₅ zvýšena ve všech případech. V případě Sudanu I míra ovlivnění jeho oxidace poklesla v případě pětikrát vyššího molárního množství cyt b₅ vůči CYP, zatímco v oxidaci fenacetinu došlo k poklesu až v desetinásobném molárním poměru obou proteinů.

Pro CYP1A2 byla použita bohatší paleta testovaných substrátů. Mimo Sudan I a hlavní markerový substrát fenacetin byl také testován acetanilid a lidokain. Výsledky ovlivnění CYP1A2 v přítomnosti cyt b₅ lze pozorovat na obrázku 51 na následující straně.



Obr. 51 Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A2 přítomností přirozené formy cytochromu b₅

Oranžové sloupce – aktivita vůči Sudanu I; fialové sloupce – aktivita vůči fenacetinu; zelené sloupce – aktivita vůči acetanilidu; modré sloupce – aktivita vůči lidokainu. Molární poměr cyt b₅ vůči CYP1A1 byl různý, což je naznačeno násobkem množství cyt b₅ na popiscích horizontální osy.

Aktivita CYP1A2 byla vlivem přidání cyt b₅ zvýšena u všech studovaných substrátů. V případě Sudanu I došlo k výraznému zvýšení v případě pětinasobného molárního nadbytku cyt b₅, což je opačný trend než v případě CYP1A1. Je však nutno poznamenat, že CYP1A2 je ve srovnání s CYP1A1 mnohem méně aktivním v případě přeměny Sudanu I.

V případě fenacetinu u CYP1A2 došlo ke zvýšení jeho oxidace za účasti všech poměrů cyt b₅ a tato tendence pokračovala s nárůstem molárního poměru cyt b₅ oproti CYP1A2. Oxidace acetanilidu byla nejvíce zvýšena v případě pětinasobného molárního nadbytku cyt b₅ v systému.

V případě metabolismu lidokainu došlo k podobné situaci jako v případě oxidace fenacetinu. Aktivita CYP1A2 byla zvýšena za přítomnosti všech molárních poměrů cyt b₅ a ovlivnění aktivity se zvyšovalo se zvyšováním množství cyt b₅ v rekonstituovaném systému.

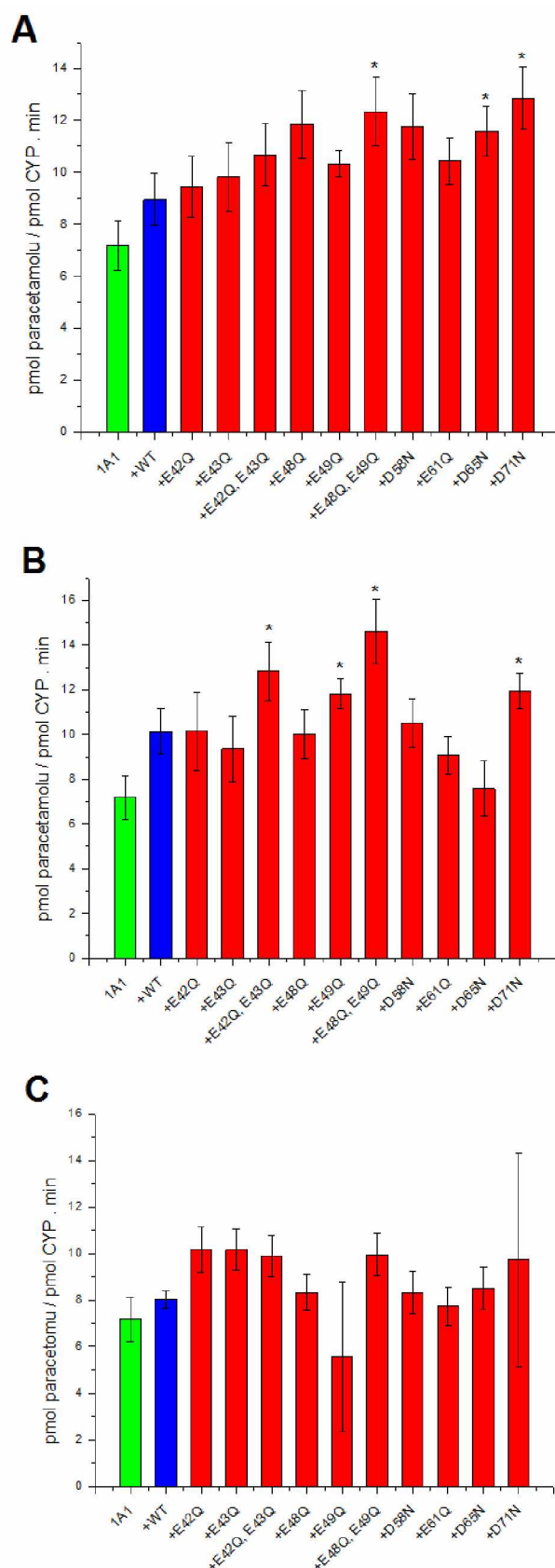
Je tedy patrné, že aktivita obou studovaných cytochromů P450 vůči všem substrátům byla zvýšena vůči všem substrátům. Přítomnost cyt b₅ tedy vede k pozitivní modulaci aktivity tohoto enzymu.

4.4.2 Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b₅

V rámci dalšího studia vlivu přítomnosti cyt b₅ v rekonstituovaném systému a ve snaze zjistit více informací o možných interakcích ovlivňujících aktivitu CYP byly do rekonstituovaného systému dodávány mutantní proteiny cyt b₅. Hledaným vlivem bylo snížení aktivity CYP v přítomnosti mutantů oproti přítomnosti přirozené formy cyt b₅, výsledky pozitivního vlivu zde tedy označují výsledky negativní, kdy došlo k navýšení aktivity oproti systému neobsahujícímu žádný cyt b₅.

Aktivita cytochromů P450 byla sledována proti výše zmíněným substrátům. V případě oxidace Sudanu I sice došlo ke změnám aktivit za přítomnosti jednotlivých mutantů, tyto výsledky se ale nedařilo zopakovat v rámci jednoho měření, a to ani při více opakováních pokusu. Důvodem mohla být složitá manipulace s velkým množstvím vzorků vyžadujících extrakci, vypařování vzorku před aplikací do separačního systému (HPLC) a složitější manipulaci se skleněným nádobím. Zmíněná látka se totiž absorbuje na „plast“ a proto je nutné veškeré inkubace a především odebrání extraktu skleněným kapátkem mohla být příčinou chyb. Množství vzorků mohlo také přispět k neúspěšnosti měření. Při rozdělení vzorků do více měření ale mohlo dojít k velkému zkreslení výsledků, kdy by nebylo možné vztáhnout výsledky na jeden výsledek systému bez přidaného cytochromu b₅.

V případě fenacetinu se i díky relativně snadné metodice podařilo výsledky získat a následně vyhodnotit. Výsledné ovlivnění CYP1A1 v různých poměrech přirozeného enzymu a mutantů ukazuje obrázek 52 na následující straně.

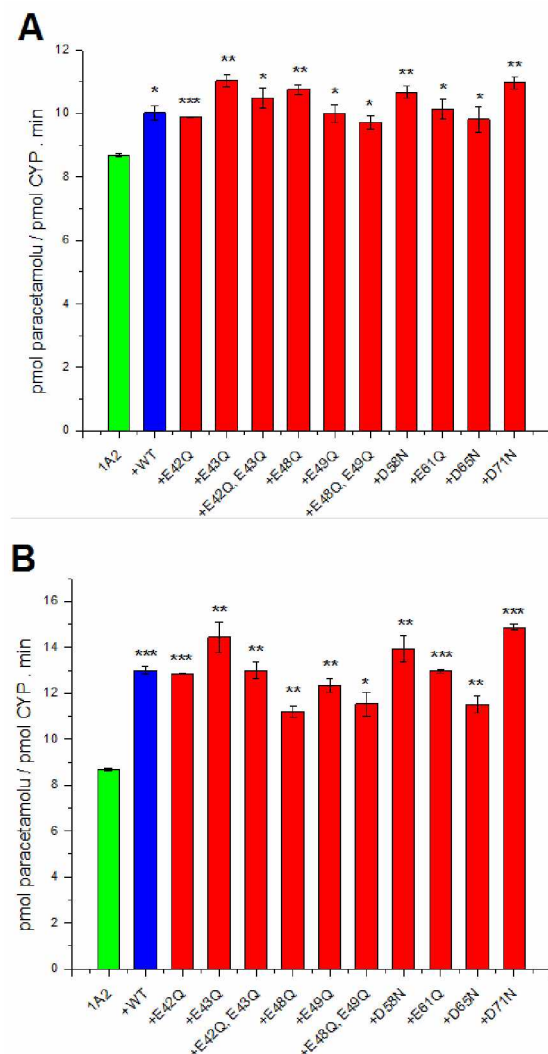


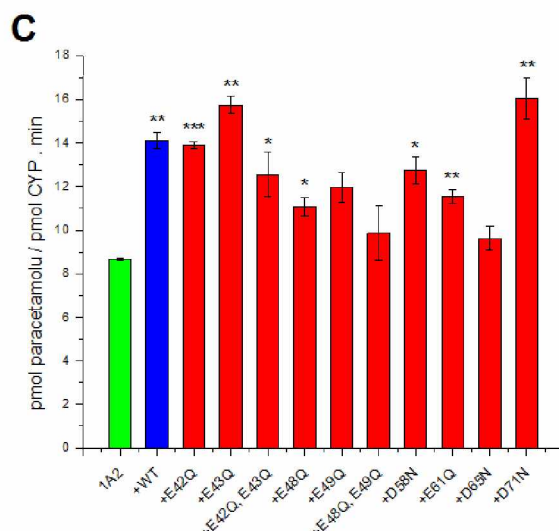
Obr. 52 Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A1 vůči fenacetinu v přítomnosti mutantů cytochromu b_5

Molární poměry CYP1A1 a cyt b_5 byly různé. A – 1:1; B – 1:5; C – 1:10.

V případě CYP1A1 nebyly výsledky neprokázaly negativní ovlivnění přítomností mutantů cyt b₅, jen mutant D65N vykázal nízkou pozitivní modulaci v případě pětinasobného molárního nadbytku.

Ovlivnění přeměny fenacetinu vlivem CYP1A2 je zobrazeno na obrázku 53.



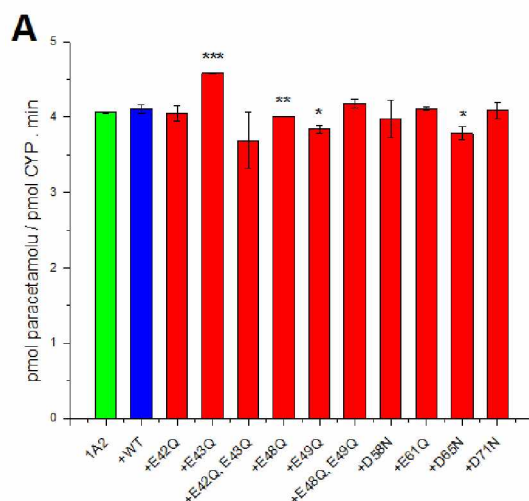


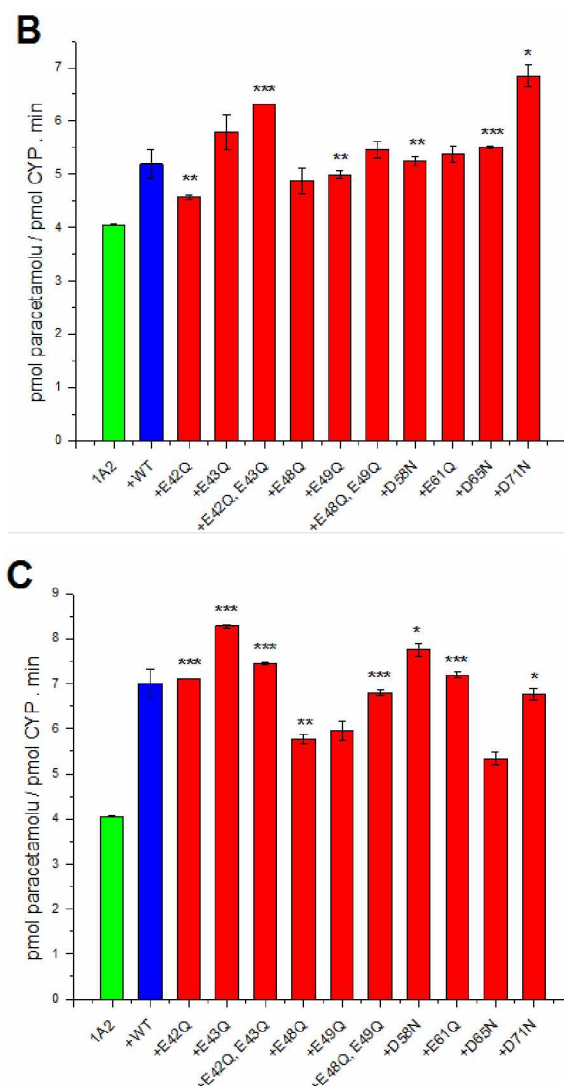
Obr. 53 Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A2 vůči fenacetinu v přítomnosti mutantů cytochromu b_5

Molární poměry CYP1A2 a cyt b_5 byly různé. A – 1:1; B – 1:5; C – 1:10.

V případě CYP1A2 se projevila snížená modulace vlivem cyt b_5 v desetinásobném přebytku mutantů D65N, E48Q, E49Q a přes zvýšenou chybu i u dvojitého mutantu E48Q/E49Q. Tendence tohoto poklesu lze pozorovat i při použití pětinasobného přebytku cyt b_5 .

Vliv na aktivitu CYP byl zjišťován i pro substrát acetanilid. V případě CYP1A1 reakce neposkytl měřitelné množství produktu. Proto jsou na obrázku 54 zobrazeny pouze výsledky pro CYP1A2.





Obr. 54 Ovlivnění metabolické aktivity CYP1A2 vůči acetanilidu v přítomnosti mutantů cytochromu b_5
Molární poměry CYP1A2 a cyt b_5 byly různé. A – 1:1; B – 1:5; C – 1:10.

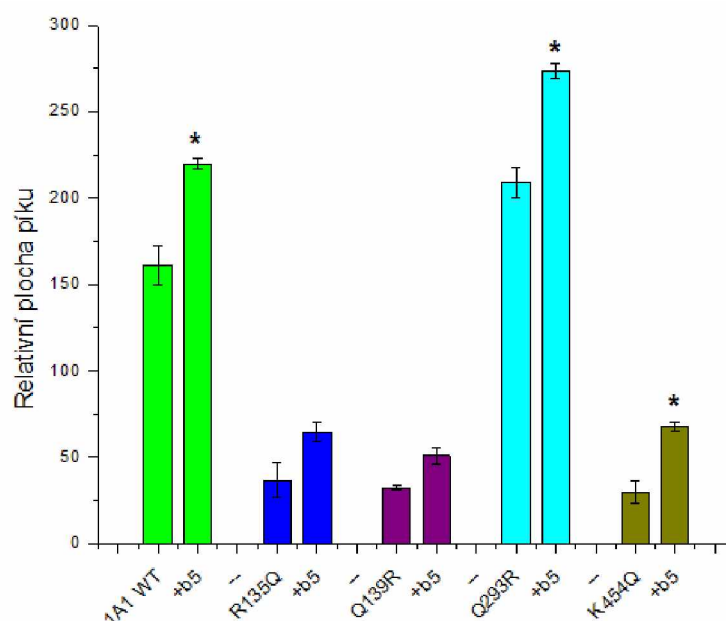
U aktivity CYP1A2 se v případě acetanilidu projevila nižší modulace vlivem cyt b_5 v desetinásobném přebytku u mutantů D65N, E48Q, a E49Q, podobně jako v případě fenacetinu. Dvojitý mutant E48Q/E49Q tentokrát sníženou modulaci nevykázal.

Z těchto výsledků se jako možné aminokyselinové reziduum cytochromu b_5 zapojené do interakce s cytochromy P450 rodiny 1 jeví D65. Jako další aminokyseliny, tentokrát zapojená do interakce s CYP1A2, mohou vystupovat E48 a E49.

4.4.3 Ovlivnění aktivity mutantních cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b₅

V rámci této části práce byly sledovány také aktivity připravených mutantních forem CYP1A1 a CYP1A2. Opět byl porovnán vliv přítomnosti přirozené formy cyt b₅ na aktivitu mutantů. Snížení vlivu mohla znamenat snížení schopnosti příslušného cytochromu P450 interagovat s cytochromem b₅.

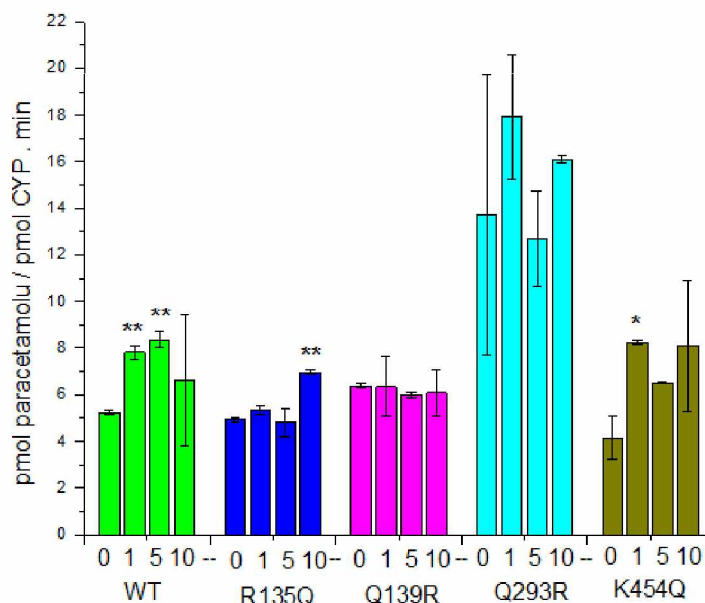
Nejprve byla stanovena aktivita mutantů CYP1A1 v reakci se Sudanem I. Výsledky je možné pozorovat na obrázku 55.



Obr. 55 Metabolická aktivita mutantů CYP1A1 vůči Sudanu I jako substrátu v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅
Molární poměr CYP1A1 a cyt b₅ byl 1:1.

Aktivita tří mutantů (R135Q, Q139R a K454Q) v reakci se Sudanem I byla ve srovnání s přirozenou formou proteinu výrazně snížena. Oproti tomu aktivita mutantu Q293R byla vyšší. Vliv přítomnosti cyt b₅ vykázal signifikantní změny u mutantů Q293R a K454Q, kdežto u mutantů R135Q a Q139R nikoliv. Tato skutečnost může poukazovat na možné zapojení těchto mutovaných pozic do zmiňované interakce.

Dále byl jako substrát CYP1A1 využit fenacetin. Všechny mutantní cytochromy P450 byly schopné jeho přeměny a metabolit byl analyzován pomocí HPLC. Výsledky vlivu na metabolickou přeměnu fenacetinu pomocí CYP1A1 ukazuje obrázek 56 na následující straně.



Obr. 56 Metabolická aktivita mutantů CYP1A1 vůči fenacetinu jako substrátu v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅

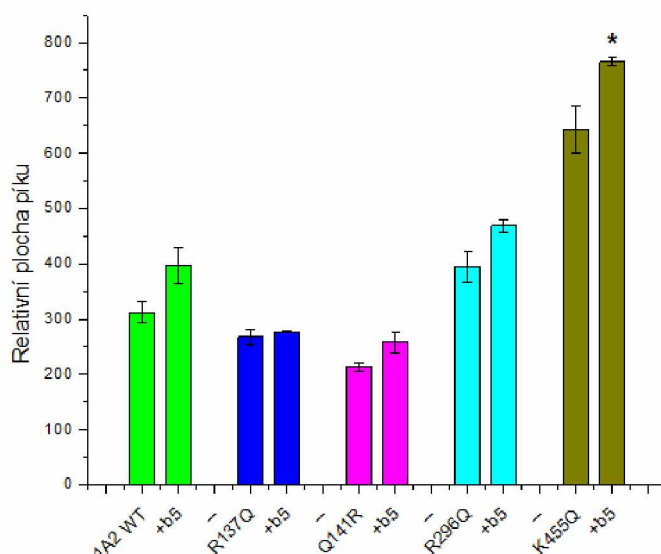
Molární poměr CYP1A1 a cyt b₅ byl různý. Molární nadbytek cyt b₅ je vyznačen v horizontální ose.

V případě CYP1A1 byla aktivita vůči fenacetinu většiny mutantů překvapivě srovnatelná s přirozenou formou. Mutant Q293 dokonce vykázal zvýšenou aktivitu, která ale byla zatížena vysokou chybou. Pouze hodnoty z ovlivnění proteinu přítomností cyt b₅ poukazují na výrazné zvýšení aktivity. U mutantů R135Q a Q139R se vliv přítomnosti cyt b₅ neprojevil až do desetinásobného molárního nadbytku proteinu. Mutant K455Q vykázal rozdílný vliv dle poměru cyt b₅.

Ve světle výsledků z obou sledovaných reakcí provedených s CYP1A1 lze vysledovat několik poznatků:

- Aktivita mutantů R135Q, Q139R a K454Q vůči Sudanu I byla snížena oproti přirozené formy. Oproti tomu, stejné mutantní proteiny vykázaly relativně podobnou aktivitu vůči fenacetinu. Aktivita mutantu Q293 nebyla postižena ani v jedné ze sledovaných reakcí.
- Snížení modulační aktivity v reakci se Sudanem I nebyla v rámci statistického zhodnocení pozorována u mutantů R135Q a Q139R. V případě fenacetinu se modulační jeho oxidace neprojevila u stejných mutantů, jen první zmiňovaný vykázal modulaci při vysokém množství cyt b₅.

V případě CYP1A2 byly provedeny experimenty se stejnými substráty. Výsledky ovlivnění mutantů CYP1A2 v reakci se Sudanem I lze pozorovat na obrázku 57.

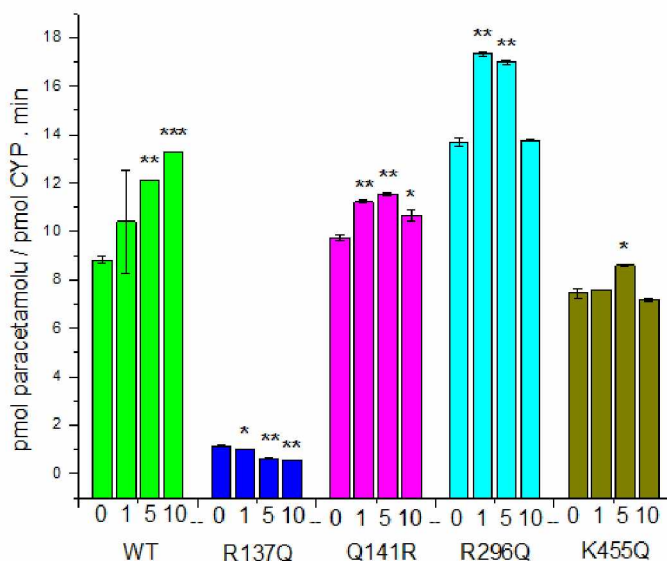


Obr. 57 Metabolická aktivita mutantů CYP1A2 vůči Sudanu I v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅

Molární poměr CYP1A2 a cyt b₅ byl 1:1.

V případě CYP1A2 došlo k mírnému snížení aktivity mutantů R137Q a Q141R, kdežto u ostatních ke snížení nedochází. Mutant K455Q dokonce vykázal výrazně zvýšenou aktivitu. Co se týče vlivu přítomnosti cyt b₅, signifikantní změnu vykázal pouze mutant K455. Výsledky s tímto mutantem jsou překvapující ve světle následných výsledků s fenacetinem a acetanilidem. To může být způsobeno odlišnou metodikou (extrakcí ethylacetátem).

Výsledky ovlivnění mutantů CYP1A2 v reakci s fenacetinem lze pozorovat na obrázku 58 na následující straně.

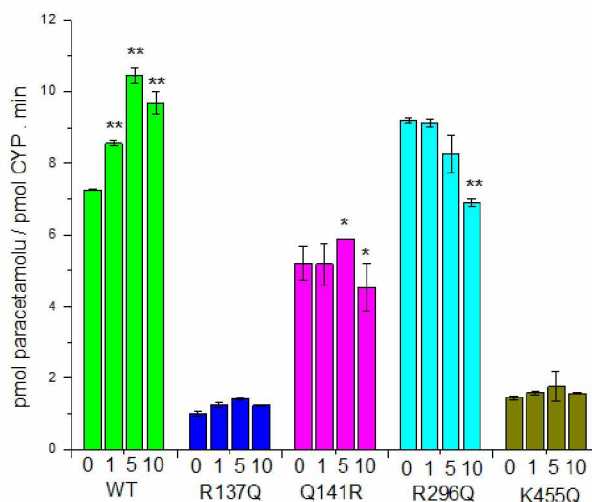


Obr. 58 Metabolická aktivita mutantů CYP1A2 vůči fenacetinu v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅

Molární poměr CYP1A1 a cyt b₅ byl různý. Molární nadbytek cyt b₅ je vyznačen v horizontální ose.

V případě CYP1A2 byla signifikantně snížena aktivita mutantu R137Q. Mutant R296Q vykázal zvýšenou aktivitu, zatímco ostatní mutanty vykázaly relativně podobnou schopnost metabolizovat fenacetin jako přirozený CYP1A2. Vliv přítomnosti cyt b₅ na aktivitu se jako snížený ukázal u mutantu K455Q a u mutantu R137Q, u kterého dokonce se zvyšující se koncentrací cyt b₅ došlo ke snížení jeho aktivity.

Jako poslední substrát byl využit acetanilid. Jak již bylo zmíněno, CYP1A1 jeho metabolismem neprovádí v dostatečné míře, proto byl acetanilid využit pouze ke stanovení vlivu na CYP1A2. Tyto výsledky ukazuje obrázek 59 na následující straně.



Obr. 59 Metabolická aktivita mutantů CYP1A2 vůči acetanilidu v přítomnosti přirozeného cytochromu b₅

Molární poměr CYP1A2 a cyt b₅ byl různý. Molární nadbytek cyt b₅ je vyznačen v horizontální ose.

Za použití acetanilidu jako substrátu se projevila jiná situace než v případě fenacetinu. Mutant R137Q sice opět vykázal výrazně sníženou aktivitu oproti přirozené formě CYP1A2, ale společně s ním byl méně aktivní i mutant K455Q. Nižší aktivitu vykázal i mutant Q141R. Co se týče vlivu přítomnosti cyt b₅, všechny mutantní formy vykázaly téměř nulové ovlivnění aktivity vůči acetanilidu v přítomnosti tohoto malého hemoproteinu.

Výsledky uvedené CYP1A2 lze shrnout takto:

- Aktivita mutantů R137Q byla snížena v oxidaci fenacetinu a acetanilidu, v případě oxidace Sudanu I byla jeho aktivita relativně podobná přirozené formě. Aktivita mutantu Q141R byla snížena v případě Sudanu I a acetanilidu, ale nikoliv v případě fenacetinu. Aktivita mutantu K455Q byla snížena u acetanilidu, relativně stejná u fenacetinu a velmi zvýšená u Sudanu I. Aktivita mutantu R296Q byla buď stejná jako přirozené formy, nebo zvýšená.
- Snížení modulační aktivity CYP1A2 přítomností cyt b₅ v oxidaci Sudanu I bylo pozorováno u mutantu R137Q. V případě fenacetinu došlo ke snížení modulační u stejného mutantu a částečně i u mutantu K455Q. V případě acetanilidu byl tento efekt pozorován u mutantů R137Q, K455Q a částečně

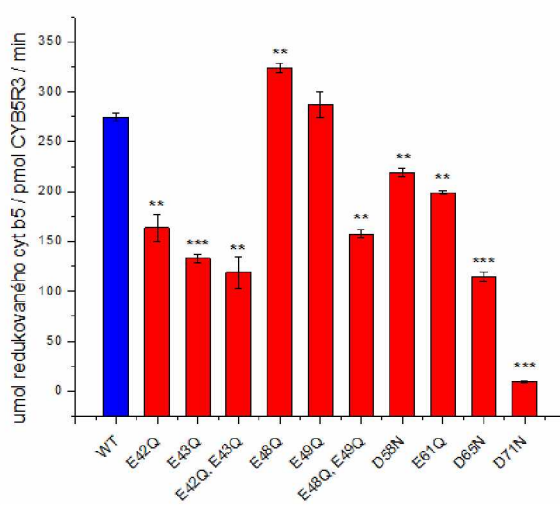
u Q141R. Také mutant R296Q u acetanilidu vykázal snížení modulační, což ale nebylo pozorováno u předchozích substrátů.

Cytochrom b_5 může ovlivňovat cytochromy P450 v závislosti na substrátu, což může být případ i zde sledovaných reakcí. To může být důvodem pro odlišné chování mutantů ve vztahu k aktivitě a snížení modulační vlivem přítomnosti cyt b_5 , především u mutantu K455Q. Lze však konstatovat, že z hlediska CYP1A2 mohou být zajímavými aminokyselinami v rámci interakce s cytochromem b_5 právě rezidua R137 a K455.

4.4.4 Ovlivnění aktivity cytochromů P450 v přítomnosti mutantů cytochromu b_5 ve spojení s NADH:cytochrom b_5 reduktasou

Purifikovaná solubilní forma NADH:cytochrom b_5 reduktasy byla použita k metabolickým studiím s oběma cytochromy P450 ve snaze získat informaci, zda je tento enzymový systém schopen poskytnout produkty již zmíněných reakcí bez přítomnosti hlavního přenašeče elektronů, NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Případné výsledky by také poukázaly na schopnost cytochromu b_5 dodávat elektrody přímo zmíněným formám cytochromu P450. To by cytochrom b_5 spolu s NADH:cytochrom b_5 reduktasou označilo za samostatný donor elektronů pro celý systém tak, jak bylo nedávno popsáno pro oxidaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1 [93,94].

Nejprve byla stanovena aktivita CYB5R3 vůči přirozené formě a mutantům cyt b_5 . Aktivita zde vlastně představuje množství redukováného cyt b_5 za jednotku času. Tyto výsledky ukazuje obrázek 60.

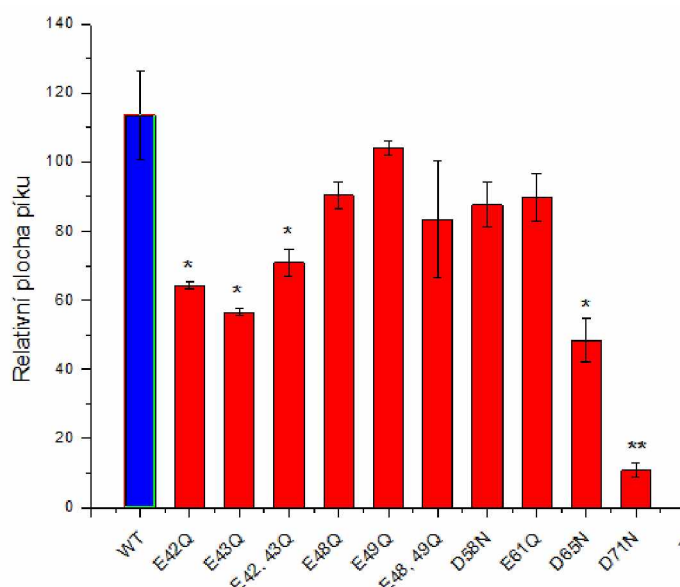


Obr. 60 Aktivita CYB5R3 vůči přirozené formě a mutantům cyt b_5

Aktivita CYB5R3 oproti některým mutantům byla většinou nižší. Jen oproti mutantům E48Q a E49Q byla aktivita vyšší nebo relativně stejná. Nejnižší aktivita byla sledována proti mutantu D71N. To může ukazovat na významnost aminokyseliny D71 v interakci cyt b₅ a CYB5R3.

Následně bylo přikročeno ke stanovení aktivity systému CYP1A1 ve spojení s CYB5R3, cyt b₅ a NADH bez přítomnosti CPR a jejího kofaktoru NADPH. Pro toto stanovení byl využit Sudan I, který jako jediný poskytoval v systému CYP s CYB5R3 měřitelné množství produktů. Ostatní substráty ve spojení s CYB5R3 a proteiny CYP1A1 a CYP1A2 neposkytly analyticky pozorovatelné množství produktů.

Po sérii zcela orientačních pokusů byl jako nejlepší poměr proteinů CYP:cyt b₅:CYB5R3 vybrán poměr 1:10:1. Zvýšení množství CYB5R3 vedlo ke zvýšení výtěžku reakce, ale poměry metabolitů vzhledem k použitým mutantům zůstaly zachovány. Také je nutno poznamenat, že v kontrolních reakcích obsahujících pouze CYB5R3 a CYP nedošlo k tvorbě měřitelného množství produktů. Výsledky ukazuje obrázek 61.



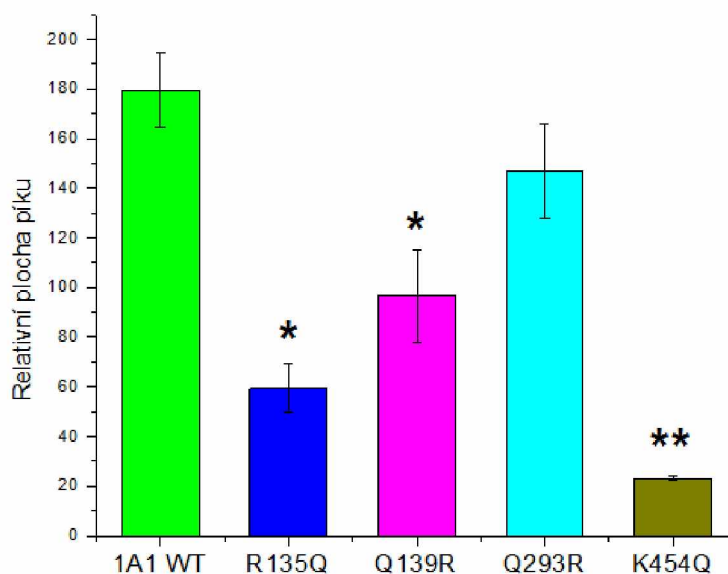
Obr. 61 Aktivita CYP1A1 vůči Sudanu I s mutanty cyt b₅ ve spojení s CYB5R3

Molární poměr CYP : cyt b₅ : CYB5R3 byl 1:10:1. V experimentech byl použit NADH jako kofaktor CYB5R3. Signifikance byla stanovena proti přirozené formě cyt b₅.

Obrázek 59 relativně připomíná stanovení aktivity samotné CYB5R3 ukázaném na obrázku 58. Rozdílné je ale poměru u dvojitého mutantu E42Q/E43Q, který i přes nižší aktivitu CYB5R3 ve spojení s jeho redukcí byl schopen dodávat více elektronů k reakci

než podobně postižený mutant E43Q. Zajímavě se také jeví „prohození“ absolutních hodnot u mutantů E48Q a E49Q. Tato data je těžší vyhodnotit, jelikož se zde projevuje možné oslabení interakce mezi cyt b_5 a CYB5R3.

V dalších experimentech byla získána i data pro mutantní formy CYP1A1 ve spojení s CYB5R3 a přirozenou formou cyt b_5 . Výsledky tohoto stanovení ukazuje obrázek 62.

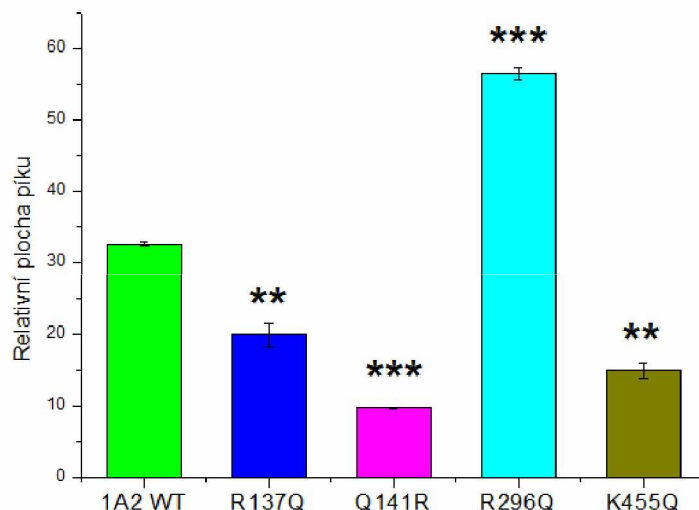


Obr. 62 Aktivita mutantů CYP1A1 rekonstituovaných s CYB5R3 a cyt b_5 vůči Sudanu I

Molární poměr CYP : cyt b_5 : CYB5R3 byl 1:10:1; v experimentech byl použit NADH jako kofaktor CYB5R3.

Aktivita téměř všech mutantních forem CYP1A1 byla oproti přirozené formě snižena, pouze mutant Q293R byl relativně stejně aktivní. Významně snižena byla aktivita mutantu K454Q.

Podobné výsledky se s využitím velkého množství proteinu podařilo získat i pro CYP1A2. Tato data ukazuje obrázek 63 na následující straně.



Obr. 63 Aktivita mutantů CYP1A2 rekonstituovaných s CYB5R3 a cyt b₅ vůči Sudanu I

Molární poměr CYP : cyt b₅ : CYB5R3 byl 1:10:1; v experimentech byl použit NADH jako kofaktor CYB5R3.

Zde byly jako méně aktivní označeny mutanti R137Q, Q139R a K455Q. Překvapením byl opět mutant R296Q, který byl výrazně aktivnější než přirozená forma proteinu.

Významným aspektem těchto experimentů je skutečnost, že v rekonstituovaném systému CYP1A1 či CYP1A2 nebyla přítomna CPR a přenos elektronů tedy mohl probíhat pouze ve směru od CYB5R3 přes cyt b₅ k CYP za využití donoru elektronů CYB5R3, NADH. Použití přirozené formy cyt b₅ zároveň zajistilo stejnou dostupnost elektronů pro všechny studované cytochromy P450. V takovém případě mohou tato data poukazovat na mutantní proteiny s vyšším významem. V případě CYP1A1 se jako zajímavé jeví mutace R135Q a K454Q. Mutant Q139R sice vykazuje také sníženou aktivitu, ale v rámci chyby se může přibližovat aktivitě přirozeného proteinu. V případě CYP1A2 se i se zvýšenou signifikancí jeví jako důležité rezidua R137, Q139 a K455. Zde je viditelný také rozdíl oproti expresně velmi těžce získatelnému mutantu R137Q, který vykazoval vyšší aktivitu oproti mutantu Q139R. V obou případech se mutanti Q293R (CYP1A1) a R293Q (CYP1A2) nevyznačují sníženou aktivitou.

Výsledky uvedené v kapitole 4.4 dosud nebyly publikovány a jsou v současnosti do časopisecké publikace zpracovávány.

5. Závěr

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí o vlastnostech cytochromů P450 rodiny 1. Především o vlivu mutací aktivního místa na nitroreduktasovou aktivitu těchto enzymů. Práce rovněž přináší informace o působení cytochromu b₅ na aktivitu cytochromů P450. Dále se zabývá možností redukce cytochromů P450 v bakteriálním systému pravděpodobně prostřednictvím flavodoxinu.

Nejdůležitější získané poznatky lze shrnout následovně:

Cytochromy P450 mohou být redukovány v bakterii *Escherichia coli*

Cytochromy P450 exprimované v *Escherichia coli* byly rozděleny na dvě skupiny, na ty které jsou snadno redukovány v bakteriálním systému, a na ty které jsou v něm redukovány minimálně. Dle sledovaných korelací využívajících výsledky molekulárního modelování sledovaných proteinů s bakteriálním flavodoxinem může být právě bakteriální flavoprotein flavodoxin odpovědný za redukci některých cytochromů P450.

Aktivační přeměna aristolochové kyseliny 1 cytochromy P450 rodiny 1 je ovlivněna aminokyselinami v jejich aktivním centru

Mutace A133S v proteinu CYP1B1 vedla ke znatelnému zvýšení nitroredukce aristolochové kyseliny I vedoucí k její aktivaci, zatímco opačný proces, tedy změny S122A a T124V v CYP1A1, respektive CYP1A2, vedly ke snížení aktivity obou enzymů ve sledované reakci. Tak byl experimentálně prokázán dříve jen teoreticky předpovězený mechanistický požadavek vhodně umístěné hydroxyskupiny pro nitroreduktasovou aktivitu cytochromů P450.

Cytochrom b₅ stimuluje aktivitu CYP1A1 a CYP1A2

V práci bylo prokázáno, že přítomnost přirozené formy cytochromu b₅ stimuluje aktivitu lidského rekombinantního cytochromu P450 1A2 vůči fenacetinu, acetanilidu a lidokainu. Potvrzena byla dříve stimulace oxidace Sudanu I enzymy CYP1A1 a 1A2 zprostředkovaná cytochromem b₅.

Aminokyselina D65 cytochromu b₅ může být zapojena do interakce tohoto proteinu s CYP podrodiny 1A

Mutant cytochromu b₅ s mutací D65N vykazoval za určitých podmínek pokles ve stimulaci sledovaných reakcí cytochromů P450.

Aminokyseliny R135, Q139 a K454 cytochromu P450 1A1 mohou být zapojena do jeho interakce s cytochromem b₅

Tendence mutantních forem CYP1A1 s mutacemi R135 a K455 k modulaci cytochromem b₅ byla snížena v případě reakce se Sudanem I a fenacetinem. Proteiny se všemi zmíněnými mutacemi také vykazali sníženou aktivitu v systému s cytochromem b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasou bez přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy.

Aminokyseliny R137, Q141 a K455 cytochromu P450 1A2 mohou být zapojena do interakce s cytochromem b₅

Tendence mutantních forem CYP1A2 s mutacemi R137 a K455 k modulaci přítomností cytochromu b₅ byla snížena v případě reakce s fenacetinem a acetanilidem. Mutant K455 vykázal tendenci modulace v případě sledování přeměny Sudanu I. Na druhou stranu, proteiny se zmíněnými mutacemi vykazaly sníženou aktivitu v systému s cytochromem b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasou 3 bez přítomnosti běžného proteinového partnera cytochromů P450.

Cytochromy P450 rodiny 1 mohou být při oxidaci Sudanu I podporovány cytochromem b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasou 3 i bez přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Systém cytochromu b₅ ve spojení s NADH:cytochrom b₅ reduktasou 3 byl schopen dodávat elektrony cytochromům P450 podrodiny 1A, a to i bez přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Vyšší schopnost přijímat elektrony od tohoto systému vykázal CYP1A1.

Část těchto získaných výsledků byla publikována formou časopiseckých příspěvků ve vědeckých periodikách. Další část výsledků se nyní do časopisecké formy zpracovává.

6. Literatura

1. Nelson, D. R.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
2. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958)
3. <http://drnelson.uthsc.edu/P450.statsfile.html> (přístup 13.6.2016)
4. Lewis, D.F., Watson, E., Lake, B.G.: *Mutat. Res.* 410, 245-270 (1998)
5. Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin W., et al: *DNA* 6, 1-11 (1987)
6. Nelson, D.R.: *Biochym. Biophys. Acta* 1814, 14-18 (2011)
7. Johnson, E.F., Connick, J.P., Reed, J.R., Backes, W.L., Desai, M.C., Xu, L., Estrada, D.F., Laurence, J.S., Scott, E.E.: *Drug. Metab. Dispos.* 42, 9-22 (2014)
8. Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., Pangborn, W.: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 118, 197-202 (2010)
9. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., Kraut, J.: *J. Biol. Chem.* 260, 16122-16130 (1985)
10. Sezutsu, H., Le Goff, G., Feyereisen, R.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
11. Rupasinghe, S., Schuler, M.A., Kagawa, N., Yuan, H., Lei, L., Zhao, B., Kelly, S.L., Waterman, M.R., Lamb, D.C.: *FEBS Lett.* 580, 6338-6342 (2006)
12. Moncrieffe, M.C., Fernandes, M.J., Spiteller, D., Martumura, H., Gay, N.J., Luisi, B.F., Leadlay, P.F.: *J. Mol. Bio.* 415, 92-101 (2012)
13. Lamb, D.C., Waterman, M.R.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (2013)
14. Oesch-Bartlomowicz, B., Oesch, F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 228-234 (2003)
15. Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansai, S., Bajpai, P.: *FEBS J.* 278, 4218-4229 (2011)
16. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.: *Chem. Rev.* 105, 2253-2277 (2005)
17. Guengerich, F.P., Munro, A.W.: *J. Biol. Chem.* 288, 17065-17073 (2013)
18. Jenkins, C.M., Waterman, M.R.: *J. Biol. Chem.* 269, 27401-27408 (1994)
19. Dong, M.S., Yamazaki, H., Guo, Z., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 11-19 (1996)

20. Meunier, B., Visser, S.P., Shaik, S.: Chem. Rev. 104, 3947-3980 (2004)
21. Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W.: Arch. Biochem. Biophys. 117, 660-673 (1966)
22. Lu, A.Y., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 243, 1331-1332 (1968)
23. Yasukochi, Y., Masters, B.S.: J. Biol. Chem. 251, 5337-5344 (1976)
24. Nebert, D.W., Wikwall, K., Miller, W.L.: Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 368 (2013)
25. Nebert, D.W., Karp, C.L.: J. Biol. Chem. 283, 36061-36065 (2008)
26. Lecour, S., Andre, C., Beaune, P.H.: Mol. Pharmacol. 50, 326-333 (1996)
27. Zanger, U.M., Schwab, M.: Pharmacol. Ther. 138, 103-141 (2013)
28. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P.: Cancer Lett. 220, 145-154 (2005)
29. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: Cancer Res. 62, 5678-5684 (2002)
30. Pavěk, P., Dvorak, Z.: Curr. Drug Metab. 9, 129-143 (2008)
31. Miksys, S.L., Tyndale, R.F.: J. Psychiatry Neurosci. 27, 406-415 (2002)
32. Sarikaya, D., Bilgen, C., Kamataki, T., Topcu, Z.: Biopharm. Drug Dispos. 27, 353-359 (2006)
33. Mercurio, M.G., Shiff, S.J., Galbraith, R.A., Sassa, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 210, 350-355 (1995)
34. Shimada, T., Fuiji-Kuriyama, Y.: Cancer Sci. 95, 1-6 (2004)
35. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N.E., Alworth, W.L., Guengerich, F.P.: Chem. Res. Toxicol. 11, 1048-1056 (1998)
36. Walsh, A.A., Szklarz, G.D., Scott, E.E.: J. Biol. Chem. 288, 12932-12943 (2013)
37. Addya, S., Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Bhagwat, S.V., Mullick, J., Avadhani, N.G.: J. Cell Biol. 139, 589-599 (1997)
38. Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Bhagwat, S.V., Biswas, G., Mullick, J., Avadhani, N.G.: J. Biol. Chem. 274, 6617-6625 (1999)
39. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm> (přístup 13.6.2016)

40. Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K., Kawajiri, K.: *J. Biochem.* 110, 407-411 (1991)
41. Tefre, T., Ryberg, D., Haugen, A., Nebert, D.W., Skaug, V., Bregger, A., Borresen, A.L.: *Pharmacogenetics* 1, 20-25 (1991)
42. Wedlund, P.J., Kimura, S., Gonzales, F.J., Nebert, D.W.: *Pharmacogenetics* 4, 21-26 (1994)
43. Kisselev, P., Schunck, W.H., Roots, I., Schwarz, D.: *Cancer Res.* 65, 2972-2978 (2005)
44. Turesky, R.J., Constable, A., Richoz, J., Varga, N., Markovic, J., Martin, M.V., Guengerich, F.P.: *Chem. Res. Toxicol.* 11, 926-936 (1998)
45. Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., Terasaki, T.: *J. Pharm. Soc.* 100, 341-352 (2011)
46. Schaefer, O., Ohtsuki, S., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, T., Saito, A., Sakamoto, A., Ishiguro, N., Matsumatu, T., Terasaki, T., Ebner, T.: *Drug. Metab. Dispos.* 40, 93-103 (2012)
47. Klein, K., Winter, S., Turpeinen, M., Schwab, M., Zanger, U.M.: *Fron. Pharmacol.* 1, article 129 (2010)
48. Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tonnies, M., Peter-Matthias, W., Gundert-Remy, U.: *Toxicol. Lett.* 164, 278-288 (2006)
49. Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzales, F.J.: *J. Biol. Chem.* 279, 23847-23850 (2004)
50. Vistisen, K., Poulsen, H.E., Loft, S.: *Carcinogenesis* 13, 1561-1568
51. Wrighton, S.A., Campanile, C., Thomas, P.E., Maines, S.L., Watkins, P.B., Parker, G., Mendez-Picon, G., Haniu, M., Shively, J.E. et al: *Mol. Pharmacol.* 29, 405-410 (1986)
52. Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R.L., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F.: *J. Biol. Chem.* 282, 14348-14355 (2007)
53. Nebert, D.W., Dalton, T.P.: *Nat. Rev. Cancer.* 6, 947-960 (2006)
54. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm> (přístup 13.6.2016)
55. Zhou, H., Josephy, P.D., Kim, D., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 23-30 (2004)
56. Jiang, Z., Dragin, N., Jorge-Nebert, L.F., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Aklillu, E., Ingelman-Sundberg, M., Hammons, G.J., Lyn-Cook, B.D., Kadlubar, F.F. et al: *Pharmacogenet. Genomics* 16, 359-67 (2006)

57. Tang, Y.M., Chen, G.F., Thompson, P.A., Lin, D.X., Lang, N.P., Kadlubar, F.F.: *Drug. Metab. Dispos.* 27, 274-280 (1999)
58. Guengerich, F.P.: *Human cytochrome P450 enzymes, v knize Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, (Ortiz de Montellano, P.R. ed.), Kluwer Academic, New York, str. 400-402 (2004)
59. Wang, A., Savas, U., Stout, C.D., Johnson, E.F.: *J. Biol. Chem.* 286, 5736-5743 (2011)
60. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R.: *Cancer Res.* 56, 2979-2984 (1996)
61. Lee, A.J., Cai, M.X., Thomas, P.E., Conney, A.H., Zhu, B.T.: *Endocrinology* 144, 3382-3398 (2003)
62. Šulc, M., Indra, R., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Environ. Mol. Mutagen.* 57, 229-235 (2016)
63. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1b1.htm> (přístup 13.6.2016)
64. Bailey, L.R., Roodi, N., Dupont, W.D., Parl, F.F.: *Cancer Res.* 58, 5038-5041 (1998)
65. Stoilov, I., Akarsu, A.N., Alozie, I., Child, A., Barsoum-Homsy, M., Turacli, M.E., Or, M., Lewis, R.A., Ozdemir, N., Brice, G., Aktan, S.G., Chevrette, L., et al: *Am. J. Human Genet.* 62, 573-584 (1998)
66. Bandiera, S., Weidlich, S., Harth, V., Broede, P., Ko, Y., Friedberg, T.: *Mol. Pharmacol.* 67, 435-443 (2005)
67. Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 33, 25-35 (2012)
68. Iba, M.M., Shin, M., Caccavale, R.J.: *Toxicology* 273, 35-44 (2010)
69. Percy, M.J., Lappin, T.R.: *Br. J. Haematol.* 141, 298-308 (2008)
70. Reddy, V.V., Kupfer, D., Caspi, E.: *J. Biol. Chem.* 252, 2797-2801 (1977)
71. Keyes, S.R., Cinti, D.L.: *J. Biol. Chem.* 255, 11357-11364 (1980)
72. Rhoads, K., Sacco, J.C., Drescher, N., Wong, A., Trepanier, L.A.: *Toxicol. Sci.* 121, 245-256 (2011)
73. Bando, S., Takano, T., Yubisui, T., Shirabe, K., Takeshita, M., Nakagawa, A.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 1929-1934 (2004)
74. Shirabe, K., Nagai, T., Yubisui, T., Takeshita, M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1384, 16-22 (1998)

75. Kawano, M., Shirabe, K., Nagai, T., Takeshita, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 666-669 (1998)
76. Keilin, D., Hartree, E.F.: *Nature* 164, 254-259 (1949)
77. Hutlquist, D.E., Passon, P.G.: *Nat. New. Biol.* 229, 252-254 (1971)
78. Fukushima, H., Grinstead, G.F., Gaylor, J.L.: *J. Biol. Chem.* 256, 4822-4826 (1981)
79. Schenkman, J.B., Jansson, I.: *Drug. Metab. Rev.* 31, 351-364 (1999)
80. Ito, A., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 243, 5922-4923 (1968)
81. Ito, A.: *J. Biochem.* 87, 63-72 (1980)
82. Garfinkel, D.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 367-379 (1963)
83. Giordano, S.J., Steggles, A.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 38-44 (1991)
84. Giordano, S.J., Steggles, A.W.: *Biochim. Biophys. Acta* 1172, 95-100 (1993)
85. Im, S.C., Waskell, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 144-153 (2011)
86. Mitoma, J., Ito, A.: *EMBO J.* 11, 4197-4203 (1992)
87. Hanlon, M.R., Begum, R.R., Newbold, R.J., Whitford, D., Wallace, B.A.: *Biochem. J.* 352, 117-124 (2000)
88. Hirano, Y., Kimura, S., Tamara, T.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71, 1572-1581 (2015)
89. Schenckman, J.B., Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* 97, 139-152 (2003)
90. Hildebrandt, A., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 66-79 (1971)
91. Durley, R.C., Mathews, F.S.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 52, 65-76 (1996)
92. Henderson, C.J., McLaughlin, L.A., Wolf, C.R.: *Mol. Pharmacol.* 83, 1209-1217 (2013)
93. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeisser, H.H., Arlt, V.M.: *Monatsh. Chem.* 147, 847-855 (2016)
94. Indra, R.: Mechanismus enzymové aktivace karcinogenů a léčiv systémem cytochromů P450: Disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2015)
95. Shimada, T., Menaugh, R.L., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 207-216 (2005)

96. Holmans, P.L., Shet, M.S., Martin-Wixtrom, C.A., Fisher, C.W., Estabrook, R.W.: Arch. Biochem. Biophys. 312, 554-556 (1994)
97. Sergeev, G.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A.: Biochemistry (Mosc.) 79, 406-416 (2014)
98. Correia, M.A., Mannering, G.J.: Mol. Pharmacol. 9, 470-485 (1973)
99. Gorsky, L.D., Koop, D.R., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 259, 6812-6817 (1984)
100. Gorsky, L.D., Coon, M.J.: Drug. Metab. Dispos. 14, 89-96 (1986)
101. Perret, A., Pompon, D.: Biochemistry 37, 11412-11424 (1998)
102. Yamazaki, H., Nakano, M., Imai, Y., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P., Shimada, T.: Arch. Biochem. Biophys. 325, 174-182 (1996)
103. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M.: Protein Expr. Purif. 66, 203-209 (2009)
104. Voice, M.W., Zhang, Y., Wolf, C.R., Burchell, B., Friedberg, T.: Arch. Biochem. Biophys. 366, 116-124 (1999)
105. Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F.P., Shimada, T., Nakajima, T., Yokoi, T.: Protein Expr. Purif. 24, 329-337 (2002)
106. Zhao, C., Gao, Q., Roberts, A.G., Shaffer, S.A., Doneanu, C.E., Xue, S., Goodlett, D.R., Nelson, S.D., Atkins, W.W.: Biochemistry 51, 9488-9500 (2012)
107. Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Černá, V., Rupertová, M., Martínek, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E.: Chem. Res. Toxicol. 25, 1075-1085 (2012)
108. Peng, H.M., Auchus, R.J.: Arch. Biochem. Biophys. 541, 53-60 (2014)
109. Naffin-Olivos, J.L., Auchus, R.J.: Biochemistry 45, 755-762 (2006)
110. Peng, H.M., Liu, J., Forsberg, S.E., Tran, H.T., Anderson, S.M., Auchus, R.J.: J. Biol. Chem. 289, 33838-33849 (2014)
111. Simonov, A.N., Holien, J.K., Yeung, J.C., Nguyen, A.D., Corbin, C.J., Zheng, J., Kuznetsov, V.L., Auchus, R.J., Conley, A.J., Bond, A.M., Parker, M.W., Rodgers, R.J., Martin, L.L.: PLoS One 10, e0141252 (2015)
112. Chen, W., Koenigs, L.L., Thompson, S.J., Peter, R.M., Rettie, A.E., Trager, W.F., Nelson, S.D.: Chem. Res. Toxicol. 11, 295-301 (1998)
113. Gao, Q., Doneanu, C.E., Shaffer, S.A., Adman, E.T., Goodlett, D.R., Nelson, S.D.: J. Biol. Chem. 281, 20404-20417 (2006)

114. Peng, H.M., Auchus, R.J.: *Biochemistry* 52, 210-220 (2013)
115. Palma, B.B., Silva, E., Sousa, M., Urban, P., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Pharmacogenet. Genomics* 23, 41-52 (2013)
116. Duarte, M.P., Palma, B.B., Gilep, A.A., Laires, A., Oliveira, J.S., Usanov, S.A., Rueff, J., Kranendonk, M.: *Mutagenesis* 20, 93-100 (2007)
117. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., Stiborová, M.: *Biochem. Pharmacol.* 82, 669-680 (2011)
118. Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Ulrichová, J., Simánek, V., Dvořák, Z., Frei, E.: *Toxicology* 302, 233-241 (2012)
119. Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 34, 55-63 (2013)
120. Stiborová, M., Moserová, M., Černá, V., Indra, R., Dračínský, M., Šulc, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Schmeisser, H.H., Phillips, D.H., Frei, E., Arlt, V.M.: *Toxicology* 318, 1-12 (2014)
121. Indra, R., Moserová, M., Kroftová, N., Šulc, M., Martínková, M., Adam, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35, 105-113 (2014)
122. Jeřábek, P., Florián, J., Stiborová, M., Martínek, V.: *Biochemistry* 53, 6695-6702 (2014)
123. Wolf, C.R., Friedberg, T.H., Pritchard, M.P.: U.S. Patent 9,255,256 (2016)
124. Mrázová, I., Moserová, M., Milichovský, J., Šulc, M., Kizek, R., Kubáčková, R., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Monatsh. Chem.* 147, 881-888 (2016)
125. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W.: *Methods Enzymol.* 185, 60-89 (1990)
126. <http://www.addgene.org/12651/> (přístup 13.6.2016)
127. http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map.pdf (přístup 13.6.2016)
128. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.: *Gene* 96, 23-28 (1990)
129. Shen, A.L., Porter, T.D., Wilson, T.E., Kasper, C.B.: *J. Biol. Chem.* 264, 7584-7589 (1989)
130. Muller, S.C.: Functional investigations of cytochrome P450 3A4: Disertační práce, Swiss Federal Institute of Technology in Zurich (2014)

131. Omuta, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2370-2378 (1964)
132. Guengerich, F.P., Martin, M.V., Sohl, C.D., Cheng, Q.: Nat. Protoc. 4, 1245-1251 (2009)
133. Guo, Z., Gillam, E.M., Ohmori, S., Tukey, R.H., Guengerich, F.P.: Arch. Biochem. Biophys. 312, 434-446 (1994)
134. Sandhu, P., Guo, Z., Baba, T., Martin, M.V., Tukey, R.H., Guengerich, F.P.: Arch. Biochem. Biophys. 309, 168-177 (1994)
135. Oprian, D.D., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 257, 8935-8944 (1982)
136. Marohnic, C.C., Panda, S.P., Martásek, P., Masters, B.S.: J. Biol. Chem. 281, 35975-35982 (2006)
137. Kobayashi, K., Iyanagi, T., Ohara, H., Hayashi, K.: J. Biol. Chem. 263, 7493-7499 (1988)
138. Nagai, T., Shirabe, K., Yubisui, T., Takeshita, M.: Blood 81, 808-814 (1993)
139. Stiborová, M., Martínek, V., Semanská, M., Hodek, P., Dračinský, M., Cvačka, J., Schmeiser, H.H., Frei, E.: Interdiscip. Toxicol. 2, 195-200 (2009)
140. Stiborová, M., Martínek, V., Schmeiser, H.H., Frei, E.: Neuro. Endocrinol. Lett. 27, 35-39 (2006)
141. Stiborová, M., Dračinská, H., Martínek, M., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H.H., Frei, E.: Chem. Res. Toxicol. 26, 290-299 (2013)
142. Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., Leone, S.: CNS Drug. Rev. 12, 250-275 (2006)
143. Brejcha, S.: Sledování biotransformační aktivity CYP1A2 pomocí modelového markeru kofeinu: Bakalářská práce PřF MU, ústav biochemie (2013)
144. Milichovský, J., Bárta, F., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V.: Int. J. Mol. Sci. 17, 213 (2016)
145. Šistková, J., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Neuro. Endocrinol. Lett. 29, 733-737 (2008)
146. Levová, K., Moserová, M., Kotrbová, V., Šulc, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Phillips, D.H., Frei, E., Schmeiser, H.H., Mares, J., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Toxicol. Sci. 121, 43-56 (2011)
147. Yun, C.H., Miller, G.P., Guengerich, F.P.: Biochemistry 39, 11319-11329 (2000)

148. Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5597-5601 (1991)
149. Shumada, T., Wunsch, R.M., Hanna, I.H., Sutter, T.R., Guengerich, F.P., Gillam, E.M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 111-120 (1998)
150. Richardson, T.H., Jung, F., Griffin, K.J., Wester, M., Raucy, J.L., Kemper, B., Bornheim, L.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Johnson, E.F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 87-96 (1995)
151. Hanna, I.H., Reed, J.R., Guengerich, F.P., Hollenberg, P.F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 206-216 (2000)
152. Gillam, E.M., Guo, Z., Martin, M.V., Jenkins, C.M., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 540-550 (1995)
153. Hálková, T., Příprava rekombinantního lidského cytochromu b₅, Diplomová práce PŘF UK, katedra biochemie (2010)
154. Harlow, G.R., Halpert, J.R.: *J. Biol. Chem.* 272, 5396-5402 (1997)
155. Hosea, N.A., Guengerich, F.P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 352, 365-373 (1998)
156. Kurian, J.R., Bajad, S.U., Miller, J.L., Chin, N.A., Trepanier, L.A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 1171-1178 (2004)
157. Miroux, B., Walker, J.E.: *J. Mol. Biol.* 260, 289-298 (1996)
158. Johnston, W.A., Hunter, D.J., Noble, C.J., Hanson, G.R., Stok, J.E., Hayes, M.A., De Voss, J.J., Gillam, E.M.: *J. Biol. Chem.* 286, 40750-40759 (2011)
159. Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., Dutton, P.L.: *Nature* 402, 47-52 (1999)
160. Culka, M., Milichovský, J., Jeřábek, P., Stiborová, M., Martínek, V.: *Neuro. Endocrinol. Lett.* 36, 29-37 (2015)
161. Stiborová, M., Bárta, F., Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V.: *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27561-27575 (2015)
162. Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer.* 113, 189-197 (2005)

7. Seznam příloh

1. Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H.H., Frei, E.: **Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I).** Chem Res. Toxicol. 26 (2), 290-299, 2013, **IF₂₀₁₃ = 4,190**

Podíl kandidáta: izolace mRNA, stanovení mRNA pomocí qPCR.

2. Culka, M., Milichovský, J., Jeřábek, P., Stiborová, M., Martínek, V.: **Ferrous and ferric state of cytochromes P450 in intact *Escherichia coli* cells: a possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions.** Neuro. Endocrinol. Lett. 36 (S1), 29-37, 2015, **IF₂₀₁₅ = 0,946**

Podíl kandidáta: Příprava plasmidů, exprese proteinů v bakteriálním systému, měření koncentrace cytochromů P450 v intaktních bakteriálních buňkách, spolupříprava publikace.

3. Milichovský, J., Bárta, F., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V.: **Active site mutations as a suitable tool contributing to explain a mechanism of aristolochic acid I nitroreduction by cytochromes P450 1A1, 1A1 and 1B1.** Int. J. Mol. Sci. 17 (2), 213, 2016, **IF₂₀₁₅ = 3,257**

Podíl kandidáta: Příprava plasmidů, mutageneze, exprese proteinů a jejich purifikace, charakterizace čistoty a koncentrace proteinů, spolupříprava publikace.

4. Mrízová, I., Moserová, M., Milichovský, J., Šulc, M., Kizek, R., Kubáčková, K., Arlt, V.M., Stiborová, M.: **Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in *Escherichia coli* and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine.** Monatsh. Chem. 147, 881-888, 2016, **IF₂₀₁₅ = 1,131**

Podíl kandidáta: spolupráce při expresi proteinů a jejich purifikace.

Svoluji k zapůjčení této disertační práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena řádná evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka